

**BMAL1 Proteininin Beyin Felci Sonrası Nöronal Sağkalım,
Doku Yeniden Modellenmesi ve Aksonal Projeksiyonlar
Üzerine Olan Etkilerinin incelenmesi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 118S306

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

Araştırmacı:

Dr. Öğr. Üye. Nurettin DİKER

NİSAN 2021
İSTANBUL

ÖNSÖZ

Sirkadiyen ritim uyku-uyanıklık döngüsü, beslenme, vücut sıcaklığı, hormon salınımları gibi birçok fizyolojik durumumuzu etkileyen, mevsimsel değişiklikler, aydınlık-karanlık döngüsü veya patofizyolojik süreçler gibi dış etkenlerden de etkilenebilen biyolojik bir döngüdür. 1970'li yıllardan günümüze kadar yapılan çalışmalarda beyin felci vakalarının görülme sıklığının sirkadiyen bir değişim gösterdiği bilinmektedir. 24 saatlik döngü içerisinde değişen fiziksel aktivitelere göre 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 ekibimiz tarafından yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmada gece beyin felci geçiren farelerde sabah beyin felci geçirenlere göre nöronal sağkalımın arttığı, apoptotik hücre sayısının ise azaldığı gösterilmiştir.

Bu bilgilerden yola çıkarak sirkadiyen ritmin belirlenmesinde ve devamlılığında önemli rolü olduğu bilinen transkripsiyon faktörü Bmal1'in beyin felci sonrası hem akut dönem hem de kronik dönemdeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla lentiviral vektörler aracılığıyla Bmal1 protein seviyesi artırılmış veya azaltılmış farelerin yanı sıra Bmal1 protein ifadesi hiç bulunmayan Bmal1 *knockout* fareler kullanılarak Bmal1'in beyin felci sonrasında nöronal sağkalım, DNA fragmantasyonu üzerine olan etkilerinin yanı sıra yapılan davranış deneyleriyle Bmal1'in beyin hasarı sonrası motor koordinasyon, lokomotor aktivite ve fonksiyonel geri kazanımları üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Yapılan immünofloresan çalışmalarla Bmal1'in aksonal plastisite, nörogenez, gliogenez ve angiogenez üzerine etkileri araştırılmıştır. Ek olarak proje kapsamında yapılan sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi aracılı proteomik analizler Bmal1 proteini ile direkt veya dolaylı olarak etkileşimde bulunan proteinlerin tanımlanmasının yanı sıra Bmal1'in beyin felci sonrasında etkilediği proteinler tanımlanmıştır.

"BMAL1 Proteininin Beyin Felci Sonrası Nöronal Sağkalım, Doku Yeniden Modellenmesi ve Aksonal Projeksiyonlar Üzerine Olan Etkilerinin incelenmesi" başlıklı 118S306 proje numaralı bu proje 1001 ARDEB programı ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	2
2.1. Beyin felci	2
2.2. Beyin felci patolojisi.....	2
2.3. Beyin felci tedavi yöntemleri.....	3
2.4. Sirkadiyen ritim	3
2.5. Sirkadiyen ritim ve beyin felci	5
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	5
3.1. Deney grupları	5
3.2. Lentivirüs üretimi.....	9
3.2.1. Lentiviral vektörler	9
3.2.2. Lentiviral vektörlerin hazırlanması	9
3.2.3. Lentiviral vektörlerin çoğaltılması	10
3.2.4. Lentivirüs üretilmesi ve saflaştırılması	10
3.2.5. Titrasyonun belirlenmesi	11
3.3. Transgenik hayvanların çiftleştirilmesi ve takibi	11
3.4. Beyin içi enjeksiyon yöntemiyle lentivirüs verilmesi	12
3.5. Beyin felci metodu.....	12
3.6. Aksonal tracer uygulaması	13
3.7. Deneyin sonlandırılması ve beyin kesimi.....	13
3.8. Davranış deneyleri	14
3.8.1. El çekme ve kavrama gücü testi	14
3.8.2. Rotarod motor koordinasyon testi.....	14
3.8.3. Kuyruktan asma testi.....	15
3.8.4. Açık/kapalı alan testi	15
3.8.5. Açık alan testi.....	15
3.8.6. Yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-maze).....	15
3.9. İmmünfloresan boyamalar.....	16

3.9.1. NeuN boyaması ile nöronal sağkalım analizi	16
3.9.2. TUNEL boyaması ile apoptoz tayini.....	16
3.9.3. BrdU boyaması	16
3.10. Western Blot	17
3.11. Proteomik analiz	18
3.11.1. Co-IP.....	18
3.11.2. FASP protokolü	18
3.11.3. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analizi	19
3.12. İstatistiksel analiz	19
4. BULGULAR.....	21
4.1. Deney hayvanlarının genotiplenmesi	21
4.2. Bmal1 shRNA klonlama ve virüs üretimi	22
4.3. Beyin felci operasyonları	24
4.4. Nöronal sağkalımın belirlenmesi ve analizi	25
4.5. DNA fragmentasyon analizi	28
4.6. Proteomik analizler	30
4.7. Western Blot aracılı protein analizi	41
4.8. Davranış Deneyleri	52
4.8.1. Hayvan ağırlığı	52
4.8.2. Açık alan testi	53
4.8.3. Kuyruktan asma testi	66
4.8.4. Rota-Rod testi	68
4.8.5. El çekme ve kavrama gücü testi.....	70
4.8.6. Yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-maze).....	74
4.8.7. Açık/kapalı alan testi	77
4.9. BrdU pozitif hücrelerin analizi	81
4.10. Aksonal geçişlerin analizi	88
4.11. Atrofi ve glial yaranın analizi	92
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	94
6. KAYNAKLAR.....	102

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1.1 Deney planı	6
Şekil 4.1.1 Bmal1 K/O genotipleme sonucu.	21
Şekil 4.2.1 Lentiviral shBmal1 virüsünün hücre kültürü ortamında test edilmesi	22
Şekil 4.2.2 Hücre kültürü ortamında shBmal1'in Bmal1 protein seviyesi üzerine olan etkilerinin Western blot tekniği ile analizi.	23
Şekil 4.3.1 Laser Doppler Akışmetresi ile beyin kan akımının takibi (Lv grupları için).	24
Şekil 4.3.2 Laser Doppler Akışmetresi ile beyin kan akımının takibi (Sh grupları için).	24
Şekil 4.3.3 Laser Doppler Akışmetresi ile beyin kan akımının takibi (KO grupları için). ...	25
Şekil 4.4.1 30 dk beyin felci sonrası NeuN boyamasının konfokal mikroskop ile analizi ..	26
Şekil 4.4.2 Lv-GFP ve Lv-Bmal1'in nöronal sağkalım üzerine etkileri	26
Şekil 4.4.3 scRNA ve shBmal1'in nöronal sağkalım üzerine etkileri	27
Şekil 4.4.4 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> farelere uygulanan beyin felci sonrasında nöronal sağkalımın analizi.....	27
Şekil 4.5.1 30 dk beyin felci sonrası TUNEL boyamasının konfokal mikroskop ile analizi	28
Şekil 4.5.2 Lv-GFP ve Lv-Bmal1'in beyin felci sonrasında apoptotik hücre ölümü üzerine etkileri.....	28
Şekil 4.5.3 scRNA ve shBmal1'in beyin felci sonrasında apoptotik hücre ölümü üzerine etkileri.....	29
Şekil 4.5.4 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> farelere uygulanan beyin felci operasyonu sonrasında apoptotik hücre sayısının analizi	29
Şekil 4.7.1 B-aktin protein seviyesi analizi.....	41
Şekil 4.7.2 Bmal1 protein seviyesi analizi	41
Şekil 4.7.3 Bmal2 protein seviyesi analizi.....	42
Şekil 4.7.4 Clock protein seviyesinin analizi	43
Şekil 4.7.5 Per-I protein seviyesinin analizi	43
Şekil 4.7.6 Per-II protein seviyesinin analizi	44
Şekil 4.7.7 p-Akt protein seviyesinin analizi.....	45
Şekil 4.7.8 p-Erk-1/-2 protein seviyesinin analizi	45
Şekil 4.7.9 p-mTOR protein seviyesinin analizi	46
Şekil 4.7.10 iNOS protein seviyesinin analizi	47
Şekil 4.7.11 eNOS protein seviyesinin analizi	47
Şekil 4.7.12 nNOS protein seviyesinin analizi	48
Şekil 4.7.13 Brevican protein seviyesi analizi.....	49
Şekil 4.7.14 Versican protein seviyesi analizi.....	49

Şekil 4.7.15 Ephrin b1 protein seviyesi analizi	50
Şekil 4.7.16 Ephrin b2 protein seviyesi analizi	51
Şekil 4.8.1.1 Davranış deneyleri süresince Lv-GFP ve Lv-Bmal1 deney grubundaki farelerin ağırlıklarının takibi	52
Şekil 4.8.1.2 Davranış deneyleri süresince scRNA ve shBmal1 deney grubundaki farelerin ağırlıklarının takibi.	52
Şekil 4.8.1.3 Davranış deneyleri süresince Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> deney grubundaki farelerin ağırlıklarının takibi	53
Şekil 4.8.2.2 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde kat ettikleri mesafe.	54
Şekil 4.8.2.2 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde kat ettikleri mesafe.	54
Şekil 4.8.2.3 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde kat ettikleri mesafe	55
Şekil 4.8.2.4 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde ortalama hızları	55
Şekil 4.8.2.5 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde ortalama hızları	55
Şekil 4.8.2.6 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde ortalama hızları	56
Şekil 4.8.2.7 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde hareketli kaldıkları süre.....	57
Şekil 4.8.2.8 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde hareketli kaldıkları süre.....	57
Şekil 4.8.2.9 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde hareketli kaldıkları süre	58

Şekil 4.8.2.10 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde hareketsiz kaldıkları süre.....	59
Şekil 4.8.2.11 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde hareketsiz kaldıkları süre.....	59
Şekil 4.8.2.12 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde hareketsiz kaldıkları süre	60
Şekil 4.8.2.13 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde merkez bölgesinde geçirdikleri süre.	61
Şekil 4.8.2.14 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde merkez bölgesinde geçirdikleri süre	62
Şekil 4.8.2.15 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde merkez bölgesinde geçirdikleri süre	62
Şekil 4.8.2.16 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde geçiş bölgesinde geçirdikleri süre.	63
Şekil 4.8.2.17 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde geçiş bölgesinde geçirdikleri süre	64
Şekil 4.8.2.18 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde geçiş bölgesinde geçirdikleri süre.....	64
Şekil 4.8.2.19 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde kenar bölgesinde geçirdikleri süre.	65
Şekil 4.8.2.20 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde kenar bölgesinde geçirdikleri süre.	65
Şekil 4.8.2.21 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde kenar bölgesinde geçirdikleri süre.	66

Şekil 4.8.3.1 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) kuyruktan asma testinde hareketli oldukları sürenin analizi.....	67
Şekil 4.8.3.2 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) kuyruktan asma testinde hareketli oldukları sürenin analizi.....	67
Şekil 4.8.3.3 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) kuyruktan asma testinde hareketli oldukları sürenin analizi.....	68
Şekil 4.8.4.1 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan Rota-Rod testi ile motor koordinasyon analizi.	69
Şekil 4.8.4.2 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan Rota-Rod testi ile motor koordinasyon analizi.	69
Şekil 4.8.4.3 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan Rota-Rod testi ile motor koordinasyon analizi.....	70
Şekil 4.8.5.1 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan grip strength testi ile çift el çekme ve kavrama gücünün belirlenmesi.....	71
Şekil 4.8.5.2 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan grip strength testi ile tek el çekme ve kavrama gücünün belirlenmesi.....	71
Şekil 4.8.5.3 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan grip strength testi ile çift el çekme ve kavrama gücünün belirlenmesi.....	72
Şekil 4.8.5.4 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan grip strength testi ile tek el çekme ve kavrama gücünün belirlenmesi.....	72
Şekil 4.8.5.5 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan grip strength testi ile çift el çekme ve kavrama gücünün belirlenmesi	73
Şekil 4.8.5.6 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan grip strength testi ile tek el çekme ve kavrama gücünün belirlenmesi.....	73

Şekil 4.8.6.1 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-Maze) platformunda açık alanda geçirdiği sürenin analizi	74
Şekil 4.8.6.2 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-Maze) platformunda kapalı alanda geçirdiği sürenin analizi.	74
Şekil 4.8.6.3 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-Maze) platformunda açık alanda geçirdiği sürenin analizi	75
Şekil 4.8.6.4 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-Maze) platformunda açık alanda geçirdiği sürenin analizi.....	76
Şekil 4.8.6.5 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan yükseltilmiş 0-labirenti platformunda açık alanda geçirdiği sürenin analizi	76
Şekil 4.8.6.6 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan yükseltilmiş 0-labirenti platformunda kapalı alanda geçirdiği sürenin analizi.	77
Şekil 4.8.7.1 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan açık/ kapalı alan platformunda açık alanda geçirdiği sürenin analizi.	78
Şekil 4.8.7.2 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan açık/ kapalı alan platformunda kapalı alanda geçirdiği sürenin analizi.	78
Şekil 4.8.7.3 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan açık/ kapalı alan platformunda açık alanda geçirdiği sürenin analizi.....	79
Şekil 4.8.7.4 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan açık/ kapalı alan platformunda kapalı alanda geçirdiği sürenin analizi.	79
Şekil 4.8.7.5 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan açık/ kapalı alan platformunda açık alanda geçirdiği sürenin analizi.	80
Şekil 4.8.7.6 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan açık/ kapalı alan platformunda kapalı alanda geçirdiği sürenin analizi.	80

Şekil 4.9.1 İskemik striatum seviyesinde BrdU, GFAP, NeuN ve DAPI boyaması	81
Şekil 4.9.2 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarında BrdU pozitif hücre analizi	82
Şekil 4.9.3 scRNA ve shBmal1 gruplarında BrdU pozitif hücre analizi.....	82
Şekil 4.9.4 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarında BrdU pozitif hücre analizi.	82
Şekil 4.9.5 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarında BrdU + NeuN pozitif hücre analizi	83
Şekil 4.9.6 scRNA ve shBmal1 gruplarında BrdU + NeuN pozitif hücre analizi.....	83
Şekil 4.9.7 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarında BrdU + NeuN pozitif hücre analizi. 84	
Şekil 4.9.8 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarında BrdU + GFAP pozitif hücre analizi.....	84
Şekil 4.9.9 scRNA ve shBmal1 gruplarında BrdU + GFAP pozitif hücre analizi	85
Şekil 4.9.10 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarında BrdU+GFAP pozitif hücre analizi 85	
Şekil 4.9.11 İskemik striatum seviyesinde BrdU, CD31 ve DAPI boyaması.....	86
Şekil 4.9.12 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarında BrdU + CD31 pozitif hücre analizi	86
Şekil 4.9.13 scRNA ve shBmal1 gruplarında BrdU + CD31 pozitif hücre analizi.....	87
Şekil 4.9.14 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarında BrdU+CD31 pozitif hücre analizi. 87	
Şekil 4.10.1 Red nükleus seviyesinden aksonal geçişlerin analizi.	88
Şekil 4.10.2 Facial nükleus seviyesinden aksonal geçişlerin analizi	89
Şekil 4.10.3 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarında red nükleus seviyesinde kontralateral (hasarsız) hemisferden ipsilateral (hasarlı) hemisfere geçen akson sayısının analizi	89
Şekil 4.10.4 scRNA ve shBmal1 gruplarında red nükleus seviyesinde kontralateral (hasarsız) hemisferden ipsilateral (hasarlı) hemisfere geçen akson sayısının analizi	89
Şekil 4.10.5 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarında red nükleus seviyesinde kontralateral (hasarsız) hemisferden ipsilateral (hasarlı) hemisfere geçen akson sayısının analizi	90
Şekil 4.10.6 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarında facial nükleus seviyesinde kontralateral (hasarsız) hemisferden ipsilateral (hasarlı) hemisfere geçen akson sayısının analizi	90
Şekil 4.10.7 scRNA ve shBmal1 gruplarında facial nükleus seviyesinde kontralateral (hasarsız) hemisferden ipsilateral (hasarlı) hemisfere geçen akson sayısının analizi	90
Şekil 4.10.8 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> gruplarında facial nükleus seviyesinde kontralateral (hasarsız) hemisferden ipsilateral (hasarlı) hemisfere geçen akson sayısının analizi.....	91
Şekil 4.11.1 Striatumda meydana gelen atrofinin analizi	92
Şekil 4.11.2 Korpuz kallozumda meydana gelen atrofinin analizi	92
Şekil 4.11.3 Gliyal yara analizi	93

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.2.3.1 Bmal1 shRNA ve Kontrol shRNA için pLVTHM vektörüne klonlanacak olan DNA dizileri	10
Tablo 4.6.1 Bmal1 ile direkt veya dolaylı yollardan etkileşimde olan proteinlerin co-IP (eş-immünopresipitasyon) proteomiks yöntemiyle belirlenmesi-1/2	31
Tablo 4.6.2 Bmal1 ile direkt veya dolaylı yollardan etkileşimde olan proteinlerin co-IP (eş-immünopresipitasyon) proteomiks yöntemiyle belirlenmesi-2/2	32
Tablo 4.6.3 Lv-Bmal1 ve Lv-GFP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve en az 1.4 kat değişim bulunan proteinlerin ısı haritası olarak gösterimi.	33
Tablo 4.6.4 ShBmal1 ve scRNA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve en az 1.4 kat değişim bulunan proteinlerin ısı haritası olarak gösterimi-1/2	34
Tablo 4.6.5 ShBmal1 ve scRNA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve en az 1.4 kat değişim bulunan proteinlerin ısı haritası olarak gösterimi-2/2	35
Tablo 4.6.6 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve en az 1.4 kat değişim bulunan proteinlerin ısı haritası olarak gösterimi-1/4	36
Tablo 4.6.7 6 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve en az 1.4 kat değişim bulunan proteinlerin ısı haritası olarak gösterimi-2/4	37
Tablo 4.6.8 6 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve en az 1.4 kat değişim bulunan proteinlerin ısı haritası olarak gösterimi-3/4	38
Tablo 4.6.9 6 Doğal tür ve Bmal1 <i>knockout</i> grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve en az 1.4 kat değişim bulunan proteinlerin ısı haritası olarak gösterimi-4/4	39

ÖZET

Beyin felci dünyada ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan ve her yıl yaklaşık olarak 6,5 milyon insanın hayatını kaybetmesine neden olan önemli bir hastalıktır. Yapılan araştırmalara göre önümüzdeki 10 yıl içerisinde beyin felci sebebiyle hayatını kaybedenlerin sayısının 12 milyona ulaşması beklenmektedir. Yüksek ölüm riskinin yanı sıra beyin felci sonrasında hayatta kalan hastalar ciddi nörolojik ve fizyolojik kısıtlamalar yaşayabilmektedir. İnsan sağlığını önemli ölçüde etkileyebilen bu hastalığın Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış tek tedavisi iskeminin başlangıcından itibaren ilk 6 saat içerisinde uygulanması gereken doku plazminojen aktivatörü tedavisidir. Kısıtlı tedavi seçeneği ve iskemi sonrasında yaşanabilecek zihinsel ve fiziksel engeller göz önüne alındığında beyin felci mekanizmasının ayrıntılı bir şekilde incelenmesine, özellikle de plastisiteye yönelik yeni hedeflerin belirlenmesine olan gereklilik açıkça görülmektedir.

1980'li yıllardan beri yapılan çoğu klinik gözleme dayalı çalışmada serebrovasküler hastalıkların zamana bağlı olarak kendine özgü bir dağılıma sahip olduğu gözlemlenmiştir. Neredeyse tüm fizyolojik durumlarımızı kontrol eden sirkadiyen ritme bağlı olarak 24 saatlik döngü sırasında değişen aktiviteler özellikle iskemi gibi patofizyolojik süreçlerin tetiklenmesine neden olabildiğini 2017 yılında Molecular Neurobiology'de yayınlanan makalemizde sıvı kromatografisi sıralı kütle spektrometresi (LC-MS/MS), planar yüzey immünolojik test (planar surface immunoassay) ve Western blot teknikleri ile tanımladık. Çalışma sonucunda sirkadiyen ritme bağlı patofizyolojik değişiklikler içerisinde en çok dikkatimizi Aril Hidrokarbon Reseptör Taşıyıcısı'nın (Bmal-1) çekmiştir. Sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde ve devam ettirilebilmesinde görevli olan Bmal-1, beyin felci gibi patofizyolojik süreçlerde özellikle sağkalım kinazları üzerinden etki gösterdiği yönünde güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Bunun yanında bmal1 gen mutasyonunun yaşlanma sürecini hızlandırdığı ve serbest oksijen radikallerinin buna paralel olarak arttığı da bilinen özelliklerindendir. Bu bilgilere ek olarak, klonladığımız lentiviral vektörler vasıtasıyla Bmal1 protein ifadesi artırılmış hücrelerde oksijen glikoz deprivasyonu sonrasında sağkalım kinazı olan Akt protein seviyesinin ve hücresel sağkalımın arttığı yaptığımız ön çalışmada gösterilmiştir. Sirkadiyen ritim ile ilgili önceki tecrübelerimiz ve yaptığımız ön çalışmadan elde ettiğimiz bulgulardan yola çıkılarak Bmal1'in beyin felci patofizyolojisinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir.

Bu proje ile Bmal1 proteininin beyin felci sonrası gelişen nöronal hasar ve apoptotik hücre ölümü üzerine etkileri lentiviral vektörler ve Bmal1 *knockout* fareler kullanarak araştırmış ve bu bulgular hücre içi sinyal yollarının analizleri ile desteklenmiştir. Farelere sensorimotor

davranış deneyleri uygulanarak; motor koordinasyon, paretik el kavrama gücü, aktivite, anksiyete ve depresyon üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. İskemi sonrası nöronal plastisite için farelere anterograt tracer enjeksiyonu yapılarak iskemi sonrası hasarsız hemisferden hasarlı hemisfere doğru oluşan aksonal projeksiyonlar değerlendirilmiştir. Sinaptik organizasyon ve nöroplastisiteden sorumlu proteinlerin analizlerinin yanı sıra iskemi sonrası yeni oluşan veya farklılaşan hücrelerin takibi yapılarak bunların nörojenез, gliogenез ve anjiyogenез üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca yapılan hedefli proteomiks (immünopresipitasyon ile kombine halindeki kütle spektroskopisi (IP-MS)) sayesinde Bmal1 proteini ile ilişkili olan proteinlerin ve sinyal yollarının belirlenmiştir.

Proje kapsamında elde edilen sonuçların Bmal1'in beyin felci sonrası nöronal sağkalım, doku yeniden modellenmesi ve aksonal projeksiyonlar üzerine etkilerinin mekanizmalarıyla beraber göstermesi amaçlanmıştır. Ayrıca hedefli proteom analizi sayesinde Bmal1'in hangi proteinler ve sinyal yollarını kullanarak etki gösterdiği belirlenecektir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hem literatürde beyin felci ve Bmal1 ile ilgili bilinmeyen konular aydınlatılmış hem de beyin felcinin klinik tedavisine yön verebilecek yeni hedef moleküllere ve/veya tedavilere ülkemizden katkı sağlanmış olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Sirkadiyen ritim, Bmal1, Plastisite, Proteomiks.

ABSTRACT

Cerebral ischemia is the second leading cause of death worldwide and is an important condition which results in about 6.5 million deaths per year. According to the studies carried out, it is predicted that 12 million people will lose their lives due to cerebral ischemia in the next 10 years. In addition to the high mortality risk associated with this disorder, patients suffered from cerebral ischemia can experience serious neurological and physiological disabilities. The only Food and Drug Administration (FDA) approved treatment of this critical disorder is the tissue plasminogen activator which must be used in first 6 hours after the onset of ischemia. When the limited treatment options as well as mental and physical handicaps that can occur following ischemia are considered, it is clear that there is a necessity for the detailed investigation of the ischemia mechanisms and especially for the determination of novel targets for plasticity.

The unique time-of-day dependent distributions in cerebrovascular disorders were observed in several clinical observational studies since 1980s. In our paper published in 2017 in *Molecular Neurobiology*, we have identified that the activities that vary during a 24-hour cycle based on the circadian rhythm which controls almost every physiological condition in our bodies, can result in the triggering of pathophysiological processes, such as ischemia using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), planar surface immunoassay and Western blot techniques. In consequence of this study, among the pathophysiological protein variations due to circadian rhythm, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (Bmal1) has gained the most attention. There are strong indications for the effects of Bmal1 which is responsible for the regulation and maintenance of circadian rhythm, are especially through the survival kinases in pathophysiological processes, such as ischemia. Furthermore, it is well known that Bmal1 gene mutation ramps up aging process and results in subsequent increase in free oxygen radicals. In addition to these, Bmal1 overexpression using lentiviral vectors that were cloned in our laboratory was demonstrated to increase protein levels of survival kinase, Akt, and enhance cell survival in our preliminary study. Based on our previous experience on circadian rhythm and the preliminary study we carried out, Bmal1 is proposed to have an important role in the pathophysiology of brain ischemia.

In this study, effects of Bmal1 protein on neuronal injury and apoptotic cell death following brain ischemia were investigated using lentiviral vectors and Bmal1 *knockout* mice, and the results of these studies were supported by intracellular signaling pathway analyses. Effects of Bmal1 on motor coordination, paretic hand grip strength, activity, anxiety and

depression were evaluated using sensorimotor behavior experiments in mice. For the neuronal plasticity following ischemia, axonal projections from the uninjured hemisphere to the injured hemisphere were analyzed using anterograde tracer injections in mice. In addition to the analyses of proteins responsible for synaptic organization and neuroplasticity, neurogenesis, gliogenesis and angiogenesis were determined by tracking the newly formed or differentiated cells after ischemia. Moreover, proteins and signaling pathways were analyzed by proteomics.

The results that will be obtained from this proposed study are aimed to demonstrate the effects of Bmal1 on neuronal survival, tissue remodeling and axonal projections along with their mechanisms. In addition, proteins and signaling mechanisms through which Bmal1 exerts its effects will be determined using large scale proteome analysis. In light of the results obtained in this study, it is believed to elucidate the unknown Bmal1 mechanisms as well as to contribute to the literature and development of novel targets and/or therapies for the clinical treatment of ischemia.

Keywords: Circadian rhythm, Bmal1, Plasticity, Proteomics.

1. GİRİŞ

Sirkadiyen ritim sadece endojen uyku-uyanıklık döngüsünün belirlenmesinde değil aynı zamanda hemen hemen tüm fizyolojik davranışlarımızın ve durumlarımızın kontrol edilmesinde de rol oynayan bir biyolojik saattir. Biyolojik ritim ışık, sıcaklık ve beslenme gibi dış faktörlerden etkilenebilmektedir. Ayrıca nörodejeneratif hastalıklar da sirkadiyen ritmin bozulmasına neden olabilmektedir. Bu bağlamda sirkadiyen ritim ve sirkadiyen ritmin düzenlenmesi ile nörodejeneratif hastalıklar arasında kuvvetli bir bağlantı olduğu düşünülmektedir (Uddin vd., 2015). Sirkadiyen ritim moleküler seviyede Bmal1 ve Clock başta olmak üzere bir dizi transkripsiyon faktörü ve gen tarafından kontrol edilmektedir. Bu genlerin ve faktörlerin kontrolü altında 24 saatlik sirkadiyen ritim döngüsü sırasında değişen fizyolojik aktiviteler özellikle beyin felci gibi patofizyolojik süreçlerin tetiklenmesine neden olabilmektedir. Sirkadiyen ritim ve beyin felci arasındaki ilişki uzun yıllardır merak edilen bir konudur. Literatürde yapılan çalışmalar genellikle fiziksel aktivite, besin alımı, stres ve ilaç gibi inme insidansını etkileyen egzogen faktörler üzerine odaklanmışken son yıllarda yapılan çalışmalar ise bu iç saatin serebrovasküler hastalıkların başlangıcında önemi bir rolünün olduğunu göstermiştir (Hastings vd., 2013; Musiek, 2015). 2017 yılında ekibimiz tarafından literatürde ilk defa sirkadiyen ritme bağlı olarak beyin felci sonrası nöronal hasarın farklı geliştiği gösterilmiştir. Yaptığımız bu çalışmadan elde edilen sonuçlar; biyolojik saatin düzenlenmesinde görevli olan transkripsiyon faktör Bmal1'in protein seviyesinin arttığını, beyin felci sonrası hasar alanının ve apoptotik hücre sayısının azaldığı, nöronal sağkalımın ise arttığı ve gösterilmiştir (Beker vd., 2017). Fakat Bmal1 protein seviyesindeki artış sirkadyen ritme bağlı değişen proteinlerden sadece biri olup bu proteinin hücre yaşamını olumlu veya olumsuz yönde etkileyip etkilemediği araştırma konusu olarak kalmıştır. Yapmış olduğumuz ön çalışmalar ise bu proteinin özellikle Akt gibi survival kinazlar ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Yaptığımız bu ön çalışmalarda Bmal1 protein seviyesini artırmak için Bmal1'in gen dizisini içeren bisistronik lentivirüs üretilmiş daha sonra bu virüsün hücre kültüründe Bmal1 protein seviyesini kontrol grubuyla (Bmal1'in klonlandığı bisistronik vektör ile transdüksiyon yapılmış grup) kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı belirlenmiştir. Lentiviral vektör vasıtasıyla Bmal1 ifadesi arttırılmış hücrelerde, oksijen glikoz deprivasyonu (beyin felcinin in vitro modeli olarak literatürde kabul görmüş ve sıklıkla kullanılan bir yöntemdir) sonrasında kontrol grubu hücrelerle kıyaslandığında hücresel sağkalımın ve sağkalım kinazı Akt'nin protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı görülmüştür.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Beyin felci

Beyin felci dünyada ölüm sebepleri arasında ikinci sırada yer alan bir hastalıktır. Her üç inme vakasından biri ölüm ile sonuçlanırken, hayatta kalanlar yaşamlarının geri kalanını ciddi nörolojik eksiklikler ile sürdürmek zorunda kalmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization) 2016 yılı istatistiklerine bakıldığında beyin felci vakalarının %87'sinin damarların tıkanmasıyla, %13'ünün ise damarların hemorajı nedeniyle olduğu görünmektedir. Genelde 65 yaşın üzerinde beyin felci insidansında bir artış gözlemlenmesine rağmen yeni doğanlarda ve çocuklarda da (0-15 yaş) görülebilmektedir (100.000'de 6,4).

2.2. Beyin felci patofizyolojisi

Beyin felci, beyni besleyen damarların tıkanması veya hemorajı sonrasında beyne yeteri miktarda oksijen ve glikoz taşınamaması sonucu oluşan patofizyolojik bir süreçtir. Buna bağlı olarak beyinde karmaşık sinyal yolları ve mekanizmalar devreye girerek hasar oluşumuna neden olmaktadır. İskemi sonrasında hasarın olduğu beyin bölgesi patofizyolojik olarak iki farklı bölümde incelenmektedir (Catanese vd., 2017; Durukan vd., 2007). Hasarlı alanın orta kısmı iskemik kor bölgesini oluşturmaktadır. Kor bölgesinde kan akımı önemli ölçüde azalmaktadır ve bu bölgede hızlı bir nekrotik hücre ölümü başlamaktadır. Hasarlı bölgenin etrafını çevreleyen bölge ise penumbra bölgesi olarak adlandırılmaktadır. Geçiş bölgesi olarak da bilinen penumbra bölgesindeki kan akımı kılcal damarlar vasıtasıyla iskemik kor bölgesine göre daha iyi durumdadır. Bu alanda yaşanan iyonik düzensizliklere bağlı olarak ortaya çıkan birtakım aktiviteler ve apoptotik hücre ölümü görülmektedir. (Dirnagl vd., 1999; Klehmet vd., 2009). Beyin felci sonrası yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu penumbra bölgesinde yaşam ile ölüm arasında kalan hücreleri kurtarmak üzerine yoğunlaşmıştır. Buradaki hücreler iskemiden dolayı sınırlı seviyede bulunan oksijen ve glikozu kullanmaya çalışmaktadır. Aynı zamanda özellikle hücre içi sinyal yollarından sağkalım kinazları hücrelerin sağkalım sürecine katkıda bulunmaya çalışmaktadır (Astrup vd., 1981; Yao vd., 2001; Zechariah vd., 2013).

Beyne yeterli miktarda oksijen ve glikoz iletilmemesine bağlı olarak iskemik alanda bir enerji eksikliği ortaya çıkmaktadır. Bu enerji eksikliği hücrelerin membran potansiyellerini kaybetmesine ve buna ek olarak ekstrasellüler sıvıya glutamat salınımına neden olmaktadır (Gascon vd., 2008; Paschen, 1996). Ekstrasellüler sıvıda biriken glutamat beyin felci patofizyolojisinde egzito toksisite olarak isimlendirilmektedir (Gascon vd., 2008; Paschen, 1996). Postsinaptik hücrelerde bulunan glutamat bağımlı NMDA (N-metil- D-aspartat) ve

AMPA (a-amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4 propionik asit) reseptörlerinin uyarılmasıyla hücre içerisine pozitif yüklü iyonların girmesine neden olmaktadır (Camacho vd., 2006; Shohami vd., 2014). Hücre içerisine giren Na^+ iyonu hücrenin membran potansiyelinin bozulmasına ve tekrardan ekstrasellüler ortama K^+ ve glutamat salınmasına neden olmaktadır. Bu süreç hasar çevresi depolarizasyonu olarak isimlendirilmektedir ve beyin felci sonrası gelişen hasarın yaklaşık %20'sinden sorumludur (Dirnagl vd., 1999). Ek olarak, hücre içerisine giren Na^+ iyonu Cl^- iyonunun da hücre içerisine girmesine neden olmaktadır. Oluşan tuz hücreler arası sıvıdan hücre içerisine su çekilmesine ve hücrede ödemin oluşmasına neden olmaktadır (McBride vd., 2016). Hücre içerisine giren bir diğer önemli iyon olan Ca^{+2} hücre içerisinde birçok sinyal yolağını aktive ederek membran hasarına ve serbest radikallerin tetiklenmesine neden olmaktadır. Ayrıca hücre içerisinde artan Ca^{+2} seviyesi mitokondri hasarına sebep olarak serbest radikallerle beraber hücrenin apoptoza gitmesine neden olmaktadır (Kunimatsu vd., 2011; Liu vd., 2015).

2.3. Beyin felci tedavi yöntemleri

Beyin felcinin bu zamana kadar bilinen tek tedavisi iskemi başlangıcından itibaren 6 saat içerisinde uygulanması gereken doku plazminojen aktivatörü tedavisidir. Bu tedavi yöntemi Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kabul edilmiş ve 1996'dan beri kullanılmakta olan tek tedavi yöntemidir.

2.4. Sirkadiyen ritim

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 (Albrecht, 2017; Robinson vd., 2014). Bunlar arasında Period1 (Per1), Period2 (Per2), Period3 (Per3), Cryptochrome1 (Cry1), Cryptochrome2 (Cry2) ve transkripsiyon faktörleri Circadian Locomotor Output Cycles Protein Kaput (CLOCK), Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (Bmal1) ve Neuronal PAS domain protein 2 (Npas2) sirkadiyen döngünün temel elemanları olarak ön plana çıkmaktadır. Bu genlerden period ve cry genlerinin aktiviteleri transkripsiyon faktörleri Bmal1/CLOCK heterodimeri tarafından kontrol edilmektedir. Bmal1/CLOCK heterodimer oluşturduktan sonra period ve cry genlerinin promoter bölgesinde bulunan E-kutusu bölgesine bağlanarak bu genin aktifleştirilmesine neden olmaktadır (Jiang vd., 2016; Xue vd., 2016). Gen çeviri işlemi tamamlandıktan sonra Per ve Cry proteinleri çekirdeğe geçmektedir. Heterodimerize bir şekilde çekirdekte bulunan Per ve Cry proteinleri CLOCK, Bmal1 ve Npas2'nin transkripsiyon aktivitelerinin baskılanmasına neden olacaktır. Bu şekilde artan Per

ve Cry, negatif geri bildirim mekanizmaları ile beraber kendi aktivitelerinin azaltılmasına neden olacaktır.

Sirkadiyen ritimden sorumlu genler suprakiazmatik nükleus dışında striatum, hipokampüs ve serebral korteks gibi farklı beyin bölgelerinde de ritmik bir salınım göstermektedir (Ko vd., 2010). Biyolojik ritmi düzenleyen proteinlerin homeostazı korumada ve nörojenezi düzenlemede önemli rolleri bulunmaktadır. Ayrıca bu proteinlerin nörodejenerasyon sonrası iyileşme mekanizmalarında sorumlu olduğu bilinmektedir. Beyinde nörojenezin gerçekleştiği hipokampüs seviyesinde sirkadiyen ritme bağlı olarak CLOCK genlerinin ekspresyonlarının düzenlendiği hem protein hem de RNA seviyesinde belirlenmiştir. Nörojenezin ritmin karanlık periyodunda arttığı; yani öğrenme, büyüme ve hafıza gibi fonksiyonların sirkadiyen ritme bağlı gerçekleştiği yönünde çıkarımlar yapılmıştır (Bouchard-Cannon vd., 2013). Bu bilgilere ek olarak öncül sinir hücrelerinin bölünme hızlarının akşam ve gece süresince en uç seviyesine ulaştığı bilinmektedir. Bunun sirkadiyen ritme bağlı moleküller tarafından düzenlenip düzenlenmediğini belirlemek adına yapılan çalışmalarda hipokampüste olgunlaşmamış öncül sinir hücrelerinin saat proteinlerini ürettiği bulunmuş ve ritimden sorumlu bazı genleri (Per-1, Per-2, Bmal-1) kalıtsal olarak silinmiş hayvanlarda nörojenezin artış gösterdiği tespit edilmiştir (Bouchard-Cannon vd., 2013; Paul vd., 2012; Zheng vd., 2010). Bu bilgilere ek olarak Akt/mTOR sinyal yollarının beyin felcinin düzenlenmesinde önemli görevlerinin olduğu grubumuz tarafından yapılan çalışmada ve ayrıca literatürdeki diğer çalışmalarda gösterilmiştir (Beker vd., 2017; Kilic vd., 2017; Zheng ve Sehgal, 2010). Akt protein, fosforlanmasını takiben GSK-3 α ve GSK3 β 'yı inhibe ederek Period proteinlerinin nükleusa geçişlerini yavaşlatarak sirkadiyen geribildirim mekanizmasının yavaşlamasına ve buna bağlı olarak döngünün uzamasına neden olmaktadır (Bouchard-Cannon vd., 2013; Malik vd., 2015). Bu durumun genetik olarak susturulmuş olan hayvanlardaki nörojenezi etkilediği düşünülmektedir.

Sirkadyen ritim proteinler içerisinde en çok dikkatimizi Bmal1 proteini çekmiştir. Bmal1 gen mutasyonunun fare ve meyve sineğinde (*Drosophila m*) yaşlanma süreçlerini hızlandırdığı ve aynı zamanda reaktif oksijen radikal artışına neden olduğu gösterilmiştir (Hood vd., 2017). İnsanlarda yapılan çalışmalarda Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalarında Bmal1 protein ifadesinin değiştiği gösterilmiştir.

Bunun yanında Bmal1 protein polimorfizminin Parkinson hastalık riskine katkı sağladığı veya eşlik ettiği düşünülmektedir (Gu vd., 2015). Bunun yanında sirkadyen ritim genlerinin depresyon ve Alzheimer gibi nörokognitif hastalıklarda rol oynadığı düşünülen genlerin regülasyonuna da katıldığı düşünülmektedir (Li vd., 2013). Buna ilaveten oksidatif stres beyin

felci, Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde rol oynamaktadır. Bu çerçevede Bmal1 proteini antioksidan respons element transkripsiyon faktör regülasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (Lee vd., 2013). Bu çerçevede yapmış olduğumuz ön çalışmalar Bmal1 proteinin beyin felci gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde de rolünün olabileceğini göstermektedir. Buna ilaveten son yıllarda yeni hedef moleküllerin bulunmasında molekül etkileşim profillerine öncelik verilmektedir (Wang vd., 2015). Önerilen bu projede olduğu gibi gelecekte yapılacak olan Bmal1 etkileşim profilinin de araştırılması hem literatür hem de yeni hedef moleküllerin tespit edilmesi açısından önem taşımaktadır.

2.5. Sirkadiyen ritim ve beyin felci

Sirkadiyen ritme bağlı olarak değişen kan basıncı, kalp atım hızı, vücut sıcaklığı ve trombosit agregasyonu gibi faktörlerin beyin felcinin tetiklenmesinde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (Kubota vd., 1987). Buna bağlı olarak beyin felci vakalarının %44'ü gibi büyük bir bölümü sabah saatlerinde görülmektedir. Ayrıca ekibimiz tarafından yapılan çalışmada beyin felci sonrası gelişen hasarın sirkadiyen ritim ile bağlantılı olarak değiştiği gösterilmiştir (Beker vd., 2017). 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 (ZT0, 06:00) 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 (Beker vd., 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Grupları

Bmal1 proteininin beyin felci sonrası patofizyolojik süreçler, plastisite ve fonksiyonel geri kazanımdaki rolünü araştırmak amacıyla, Bmal1 geni kodlamayan transgenik farelerin kullanılması planlanmıştır. Bunun yanı sıra, lentiviral yöntemlerle Bmal1 protein seviyesi arttırılmış veya azaltılmış doğal tür farelerin de, kullanılmasıyla elde edilen sonuçların doğruluğu valide edilebilmiştir. Beyin felci modeli olarak, görece daha hafif hasara neden olan 30 dakikalık orta serebral arter tıkanması metodu (Beker vd. 2015) kullanılmıştır. Bu amaç için deney grupları belirlenirken, kontrol grubu (Lv-Kontrol), Bmal1 proteininin lentiviral yöntemlerle normalden çok ifade edildiği grup (Lv-Bmal1), Bmal1 proteininin ifadesinin lentiviral shRNA yöntemiyle baskılandığı grup (Bmal1 shRNA) ve Bmal1 proteininin hiç üretilmediği transgenik hayvan ve bu deney gruplarına uygun kontrol grupları (Bmal1 shRNA için kontrol shRNA ve Bmal1 *knockout* için doğal tür) kullanılması önerilmiştir. Bmal1 transgenik fare ve shRNA yöntemiyle doğal tür farenin Bmal1 üretiminin baskılanması gruplarının karşılaştırılmasıyla birlikte, doğuştan itibaren Bmal1 proteini olmayan (Bmal1 transgenik fare grubu) ile iskemi sırasında üretimi baskılanmış Bmal1'in (shRNA grubu) karşılaştırılması sonucu sirkadyen bir protein olan Bmal1'in sistemik bir etkisini olup olmadığı da araştırılabilmiştir. 3 farklı ana grubun kendi kontrolleri ile toplam 6 farklı grup oluşturulmuştur. Bu gruplar;

Lv-Bmal1: Aril Hidrokarbon Reseptör Taşıyıcısı (Bmal-1) protein seviyesini arttırmak için moleküler klonlama teknikleri kullanılarak fare Bmal1'in 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 verilmiştir. Bu sayede iskemi sırasında Bmal1 protein seviyesi arttırılmıştır.

Lv-Kontrol: 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 araştırılabilmiştir.

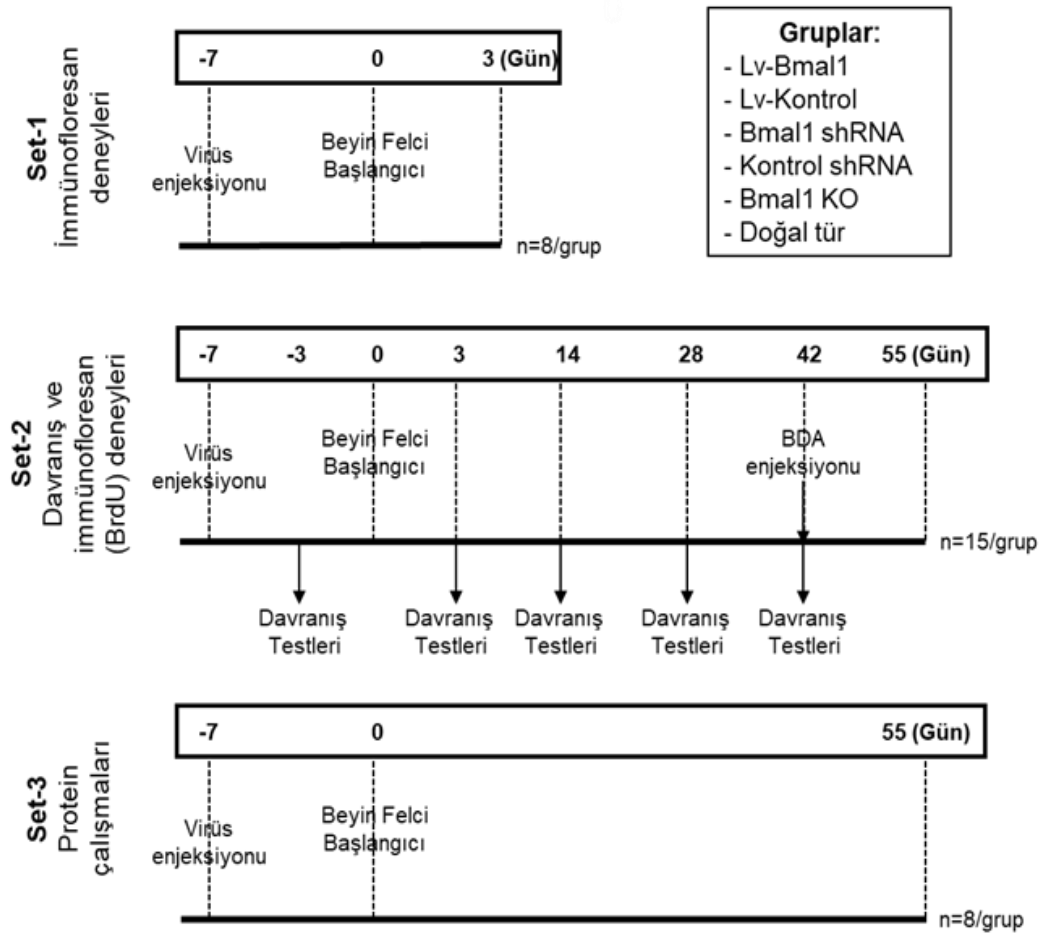
Bmal1 shRNA: Bmal1 genini hedef alan lentiviral shRNA beyin felci operasyonlarından 7 gün önce iskeminin indükleneyeceği striatum seviyesine beyin içi enjeksiyon ile verilmiştir. Bu sayede beyin felci sırasında Bmal1 protein seviyesi azaltılmıştır.

Kontrol shRNA: 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 sayede gen susturma için kullanılan lentiviral vektörün etkisinin olup olmadığı gözlemlenmiştir.

Bmal1 knockout: Bmal1 geninin ekzon 4 ve ekzon 5 bölgesinde hedeflenmiş mutasyon yapılarak elde edilen transgenik farelerde Bmal1 protein ifadesi bulunmamaktadır. Bu sayede Bmal1 genine sahip olmayan farelerde beyin felci sonrası gelişen süreçlerin incelenmesi sağlanmıştır.

Doğal tür: Bmal1 knockout grubunun kontrolü için Bmal1 gen ifadesi bulunan doğal fare (C57BL6/J) grubudur. Bu sayede Bmal1 knockout grubundaki Bmal1 genini içermeyen C57BL6/J farelerin etkisi araştırılabilmiştir.

Yukarıda belirtilen grupların amaç ve hedef bölümünde belirtilen hedeflere ulaşabilmesi için 3 farklı deney seti tasarlanmıştır.



Şekil 3.1.1 Deney planı.

Bu çalışmada 155 adet 8-12 haftalık erkek C57BL6/J ve 31 adet Bmal1 geni silinmiş erkek transgenik fare (B6.129-Arntl1m1Bra/J, 009100, Jackson Laboratory) olmak üzere toplam 186 adet fare kullanılmıştır. Farelere 30 dakikalık orta serebral arter (OSA) tıkanması metodu uygulanmıştır. Bu metot iskeminin indüklendiği hemisferde nöronal hücre hasarının ve

apoptotik hücre ölümünün araştırılması için en uygun metot olduğu için seçilmiştir (Hermann vd., 2001b; Kilic vd., 2008).

Set 1: Bmal1'in beyin felci sonrası gelişen nöronal hasar ve apoptotik hücre ölümü üzerine olan etkilerini araştırmak amacıyla beyin felci operasyonlarından 7 gün önce beyin içi enjeksiyon ile Lv-Bmal1, Lv-Kontrol, Bmal1 shRNA, kontrol shRNA veya PBS (Bmal1 *knockout* ve doğal tür için) enjeksiyonları yapılmıştır. 7 gün sonra 30 dk OSA tıkanmasını takiben 72 saat reperfüzyon gerçekleştirilmiştir. Doğal tür ve Bmal1 geni silinmiş transgenik farelere ise enjeksiyonun kontrolü amacıyla yine iskemiden 7 gün önce çözücü (PBS) enjeksiyonu yapılmıştır. 72 saat sonunda sakrifiye edilen farelerden alınan koronal kesitlerden DNA fragmentasyonu ve nöronal sağkalım analizi yapılmıştır. Ek olarak bu deney setinden elde edilen protein örneklerinden Bmal1 ile etkileşime giren proteinlerin proteomik analizini gerçekleştirmek için co-IP (eş-immünopresipitasyon) metodu kullanılmıştır.

Set 2: Beyin felci operasyonlarından 7 gün önce beyin içi enjeksiyon tekniği kullanılarak Lv-Bmal, Lv-GFP, Bmal1 shRNA veya kontrol shRNA virüsleri iskeminin indükleneyeceği sol hemisfere verilmiştir (Cheng vd., 2011; Shruster vd., 2012). Doğal tür ve Bmal1 geni silinmiş transgenik farelere ise enjeksiyonun kontrolü amacıyla yine iskemiden 7 gün önce çözücü (PBS) enjeksiyonu yapılmıştır. Beyin içi enjeksiyonundan üç gün sonra (beyin felci operasyonundan 4 gün önce) operasyon öncesi (baseline) davranış deneyleri yapılmıştır. 30 dk'lık beyin felci operasyonları filament tekniği kullanılarak indüklendikten sonra reperfüzyonun 3., 14., 28. ve 42. günlerinde davranış testleri tekrarlanmıştır. Ayrıca beyin felci sonrası yeni oluşan veya farklılaşan hücreleri takip edebilmek için beyin felci operasyonlarından üç gün sonra üçer gün aralıklarla farelere periton içi enjeksiyon yöntemiyle 100 mg/kg dozunda 5-bromo-2'-deoksüridine (BrdU, B5002, Sigma Aldrich) verilmiştir. Ek olarak, kontralateral hemisferden ipsilateral hemisfere uzatılan aksonal projeksiyonların değerlendirilebilmesi için kontralateral hemisferin motor korteks seviyesine biyotinlenmiş dekstran amine (BDA, D1956, Invitrogen) enjeksiyonu yapılmış ve 10 gün anterograd bir şekilde taşınması için beklenmiştir. 55. günde fareler kardiyak perfüzyon ve fiksasyon yöntemi kullanılarak sakrifiye edilmiştir.

Set 3: Sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde önemli bir rolü bulunan Bmal1 proteininin beyin felci sonrası uzun dönemdeki rolünü araştırmak için bu deney seti düzenlenmiştir. 55 gün sonra özellikle sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde görevli olan sirkadiyen ritim proteinleri ve plastisite ile ilgili protein seviyeleri belirlenmiştir. Ek olarak bu deney setinden elde edilen protein örneklerinden Bmal1 ile etkileşime giren proteinlerin proteomik analizini gerçekleştirmek için co-IP (eş-immünopresipitasyon) metodu kullanılmıştır.

3.2. Lentivirüs üretimi

Laboratuvarımızda rutin olarak lentiviral klonlamalar ve virüs üretimi yapılmaktadır.

3.2.1. Lentiviral vektörler

Bu çalışmada yüksek miktarda virüs partikülü elde edebilmek amacıyla ikinci jenerasyon lentiviral vektörler tercih edilecektir. Projemizde, paketleme plazmidi olarak psPAX (<https://www.addgene.org/12260/>) ve zarf plazmidi olarak pMD2.G (<https://www.addgene.org/12259/>) kullanılmıştır. Ekspresyon plazmidi olarak GFP içeren bisistronik vektör (Lenti-CMV-GFP-2A-Puro Vector, ABM) kullanılmıştır.

3.2.2. Lentiviral vektörlerin hazırlanması

Yaptığımız ön çalışmalarda fare Aril Hidrokarbon Reseptör Taşıyıcısı (Bmal-1) geninin kodlama bölgesi (NCBI referans dizisi: NM_007489.4) fare nöroblastoma hücresi cDNA'sından 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' kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak çoğaltılmıştır. PZR sonrasında elde edilen örnekler %1'lik agaroz jel kullanılarak yürütülmüş ve 1881 baz çiftine denk gelen bant kesilerek jelden DNA izolasyonu kiti (PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit, Invitrogen) kullanılarak izole edilmiştir. Elde edilen DNA ürünü ve bisistronik vektör, Sall (FD0644 Thermo Fisher) ve BamHI (FD0054 Thermo Fisher) kesim enzimleri kullanılarak kesilmiştir. PZR ürünü ile klonlamanın yapılacağı bisistronik vektörün konsantrasyonları belirlendikten sonra ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ligasyon ürünleri soğuk 100mM CaCl₂ ile kompetent hale getirilmiş olan Stbl3 bakterilerine ısı şoku yöntemi kullanılarak transformasyon yapılmıştır. Sonrasında bakteriler kanamisin içeren LB agarda çoğaltılarak antibiyotiğe dirençli olarak çoğalmış olan kolonilerden Bmal1 genini içeren koloniler tespit edilmiş ve gen dizisinin doğruluğu konfirme edilmiştir.

Bmal1 genini susturmak amacıyla shRNA yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla Bmal1 genini hedef alan dört farklı shRNA (dizileri Tablo 1'de verilmiştir) lentiviral vektöre (pLVTHM (<https://www.addgene.org/12247/>)) klonlanmıştır. Ayrıca shRNA için kullanılan lentiviral vektörün herhangi bir etkisinin olup olmadığı ise kontrol shRNA (scrambled shRNA) ile belirlenmiştir. shRNA üretimi için birbirine komplementer olacak şekilde ileri ve geri oligonükleotid dizisi sentezletirilmiştir. Sonrasında bu diziler 95 °C'de 5 dk ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığında kademeli olarak soğumaları sağlanmıştır. Sonrasında elde edilen örnekler ve shRNA vektörü ligasyon yöntemi kullanılarak birleştirilmiştir. Transformasyon için yukarıda anlatılan protokol uygulanmıştır. Transformasyon sonrasında örnekler ampisilin içeren LB agar

besi yerinde büyütülmüştür. Elde edilen kolonilerin shRNA dizilerini içerip içermediği DNA dizilime yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.3. Lentiviral vektörlerin çoğaltılması

Dizileme sonucunda doğruluğu konfirme edilen plazmidlerin virüs üretiminde kullanılmaları için yüksek miktarda üretilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla yukarıda anlatıldığı gibi plazmidler Stbl3 suşu kompetent bakterilere transformasyon ile verilmiş ve bakteriler uygun antibiyotik (GFP ve Bmal1 ekspresyon plazmidi için kanamisin; shRNA, psPAX ve pMD2.G için ampicilin) 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.

Tablo 1. Bmal1 shRNA ve Kontrol shRNA için pLVTHM vektörüne klonlanacak olan DNA dizileri.

Bmal1 shRNA-1 Pf	CGC GTC CCC GGA TGG CTG TTC AGC ACA TGA TTC AAG AGA TCA TGT GCT GAA CAG CCA TCC TTT TTG GAA AT
Bmal1 shRNA-1 Pr	CGA TTT CCA AAA AGG ATG GCT GTT CAG CAC ATG ATC TCT TGA ATC ATG TGC TGA ACA GCC ATC CGG GGA
Bmal1 shRNA-2 Pf	CGC GTC CCC GCA AAC TAC AAG CCA ACA TTT TTC AAG AGA AAA TGT TGG CTT GTA GTT TGC TTT TTG GAA AT
Bmal1 shRNA-2 Pr	CGA TTT CCA AAA AGC AAA CTA CAA GCC AAC ATT TTC TCT TGA AAA ATG TTG GCT TGT AGT TTG CGG GGA
Bmal1 shRNA-3 Pf	CGC GTC CCC GCA ACA GGC CTT CAG TAA AGG TTC AAG AGA CCT TTA CTG AAG GCC TGT TGC TTT TTG GAA AT
Bmal1 shRNA-3 Pr	CGA TTT CCA AAA AGC AAC AGG CCT TCA GTA AAG GTC TCT TGA ACC TTT ACT GAA GGC CTG TTG CGG GGA
Kontrol shRNA Pf	CGC GTC CCC GGA ACG TCT AGG CGC TAA CAA TTC AAG AGA TTG TTA GCG CCT AGA CGT TCC TTT TTG GAA AT
Kontrol shRNA Pr	CGA TTT CCA AAA AGG AAC GTC TAG GCG CTA ACA ATC TCT TGA ATT GTT AGC GCC TAG ACG TTC CGG GGA

3.2.4. Lentivirüs üretilmesi ve saflaştırılması

Virüs paketlenmesi için HEK293T hücre hattı kullanılmaktadır. Bu hücre hattı virüs üretimi için rutin olarak kullanılan ve ekibimiz tarafından uzun yıllardır çalışılan bir hücre hattıdır. Hücrelerinin kültür ortamı (DMEM, P04-01158, Pan Biotech) %10 Fetal sıgır 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 içeren 37 °C 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 plazmidi (Bmal1 veya GFP) veya shRNA plazmidi (Bmal1 shRNA veya kontrol shRNA), 7 µg psPAX ve 3.5 µg pMD2.G plazmidi Lipofectamin 3000 (L3000015,

Thermo Fisher) transfeksiyon kiti kullanılarak hücrelere verilmiştir. Lipofectamine 3000 ile oluşturulacak olan DNA-lipit kompleksi hücrelerin üzerine damla damla eklenerek 6 saat süresince %5 CO₂ 37 °C inkübatörde (Heracell 150i, Thermo Fisher) inkübasyona alınmıştır. 6 saat sonrasında hücrelerin kültür ortamı taze kültür ortamı ile değiştirilmiştir. Transfeksiyondan 24 ve 52 saat sonrasında 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) alınacaktır. Dört °C, 100,000 g'de 120 dk süresince santrifüj edilen örneklerden elde edilen pellet dPBS kullanarak çözündürülerek alikotlar halinde -80 °C'de saklanacaktır.

3.2.5. Titrasyonun belirlenmesi

Akış Sitometrisi yöntemi kullanılarak üretilen virüslerin titrasyonu yapılmıştır. Bu amaçla 6- kuyucuklu hücre plakasına HCT116 hücre hattının ekimi yapılmış ve bir gece hücrelerin plaka yüzeyine tutunmaları için %5 CO₂ içeren 37 °C inkübatörde bekletilmiştir. Ertesi gün dPBS kullanılarak 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 hücrelerin besi yerleri çekilecek, 750 µl dPBS ile yıkanacak, 200 µl %0,25'lik 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 süresince santrifüj yapılarak hücreler çöktürülmüştür. Çöktürülen hücreler %1 PFA içeren dPBS içerisinde fikse edilmiş, tekrar çöktürülerek dPBS içerisinde süspansiyon haline getirilmiştir. Daha sonra, Akış sitometrisi cihazı (Cell Sorter, BD Influx) kullanılarak GFP pozitif hücreler analiz edilmiş ve virüs titrasyonu hesaplanmıştır. Bütün gruplara 1.6×10^7 virüs partikülü 2 µl 0.1 M PBS içinde beyin içi enjeksiyon ile striatum seviyesine verilmiştir (Hermann vd., 2001a; Kim vd., 2014). Titrasyon ve volum belirlenmesinde daha önce yapmış olduğumuz çalışmalar dikkate alınmıştır (Kilic vd., 2002).

3.3. Transgenik hayvanların çiftleştirilmesi ve takibi

Bmal1'i silinmiş transgenik farelerin (B6.129-Arntltm1Bra/J, 009100, Jackson Laboratory) alımı ve bakımı İstanbul Medipol Üniversitesi MEDİTAM tarafından desteklenmiştir. Fareler yurtdışından alınmıştır ve üretimleri başlatılmıştır. Bu farelerin sirkadiyen ritimden sorumlu olan Bmal1 geninin ekzon 4 ve ekzon 5 bölgesinde hedeflenmiş mutasyon yapılmıştır ve ayrıca bu bölgelere neomisin bölgesi eklenmiştir. Bu transgenik farelerin üretimi için doğal tür C57BL6 fareler ile heterozigot B6.129-Arntltm1Bra/J fareler çiftleştirilmiştir. Elde edilen farelerin Bmal1 mutant olup olmadığını analiz edebilmek için

genotipleme yapılmıştır. Bunun için standart polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılmıştır. Bu amaçla Bmal1 mutant ve yaban tipi için ortak ileri primer 5'- GCC CAC AGT CAG ATT GAA AAG -3' kullanılmıştır. Bmal1 mutant için 5'- GCC TGA AGA ACG AGA TCA GC -3' ve doğal tür için 5'- CCC ACA TCA GCT CAT TAA CAA -3' geri primerleri kullanılmıştır.

3.4. Beyin içi enjeksiyon yöntemiyle lentivirüs verilmesi

Lv-Bmal1, Lv-Kontrol, Bmal1 shRNA ve kontrol shRNA gruplarında kullanılan farelere beyin içi enjeksiyon yöntemi kullanılarak gruplarına uygun lentivirüs verilmiştir. Kontrol gruplarına ise sadece çözücü (dPBS) verilmiştir. Bu amaçla deney hayvanları gaz anestezi sistemi ((%1 İzofluran (N0015A09, Adeka) (%30 O₂, kalanı N₂O)) kullanılarak anesteziye alındıktan sonra stereotaktik çerçeveye (frame) (50260, World Precision Instruments) sabitlenmiştir. Kafatası derisine yapılan küçük bir kesi sonrasında, iskeminin yapılacağı sol hemisferin striatum seviyesine (Bregma 0, lateral 2,5 mm) tur aleti (H37L1, Marathon, Kore) kullanılarak bir delik açılmıştır. Buradan hamilton enjektörü vasıtasıyla korteks seviyesinden 2,5 mm içeri girilerek lentivirüslerin enjeksiyonları yapılmıştır. Enjeksiyon sonrasında hamilton enjektörünün iğnesi beyne zarar vermemek için yavaş bir şekilde çıkartılmıştır. Daha sonra kesilen deri 5,0 ipek dikiş ipliği (S1165, Doğsan) kullanılarak cerrahi olarak dikilmiştir.

3.5. Beyin felci metodu

Deney gruplarında kullanılan fareler gaz anestezi sistemi (%1 İzofluran (N0015A09, Adeka) (%30 O₂, kalanı N₂O)) kullanılarak anesteziye alınmıştır. Hayvanların operasyonlar süresince vücut sıcaklıkları homeotermik ısıtma sistemiyle (55-7020, Harvard Apparatus) 36,5-37,0 °C arasında tutulmuştur. OSA'nın beslediği beyin bölgesindeki kan akımı kafatası kemiği üzerine yerleştirilen (Bregma -2 mm posterior; 6 mm lateral) Laser Doppler flowmetre (LDF) cihazının (Perimed) fiber optik probu sayesinde anlık olarak izlenmiştir. Beyin felci metodu filament tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca farelerin boyun bölgesine yapılacak küçük bir kesi sonrasında karotid arterler izole edilmiştir. Kommon karotid arter ve eksternal karotid artere 6,0 ipek (S1165, Doğsan) ipe düğüm atıldıktan sonra internal karotid arter geçici olarak bir mikrovasküler klips (FE691, Aesculap) yardımıyla 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 (Beker vd., 2015). Reperfüzyonun kontrolü amacıyla LDF kayıtları reperfüzyon başlangıcından itibaren 20 dk daha takip edilmiştir.

3.6. Aksonal tracer uygulaması

İskemiden sonra kontralateral hemisferden ipsilateral hemisfere uzatılan aksonların değerlendirilebilmesi için tracer enjeksiyonu yapılmıştır. Ekibimiz tarafından rutin olarak tracer enjeksiyonları yapılmakta ve aksonal projeksiyonlar yüksek çözünürlüklü mikroskoplar vasıtasıyla analiz edilebilmektedir (Kilic vd., 2014). Bu tecrübemizden yola çıkarak beyin felcinden 45 gün sonra fareler gaz anestezi sistemi ile anesteziye alındıktan sonra stereotaktik çerçeveye (frame) yerleştirilmiştir. Sonrasında kafatası tur aleti kullanılarak kontralateral hemisferde bregmaya 0,5 mm rostral ve 2,5 mm lateral koordinatlar delinmiştir. Sonrasında hamilton enjektörü vasıtasıyla %10 biyotinlenmiş dekstran amin (BDA, D1956, Invitrogen) kontralateral hemisfere verilmiştir. Her fareye toplam 2,1 µl BDA motor kortekse rostral, medial ve kaudal olarak eşit olacak şekilde dağıtılmıştır. Bunun için hamilton enjektörünün iğnesi orta çizgiye 45°, 90° ve 135° açıyla 1,5 mm derinliğe batırılmıştır (Herz vd., 2012). Sonrasında farelerde açılan yara 5,0 ipek dikiş ipliği (S1165, Doğsan, Türkiye) kullanılarak kapatılmıştır. Tracer enjeksiyonu yapılan farelere enjeksiyondan 10 gün sonra (beyin felcinden 55 gün sonra) kardiyak perfüzyon/fiksasyon yöntemi kullanılarak sonlandırılmıştır.

3.7. Deneyin sonlandırılması ve beyin kesimi

Set 1 için kullanılan fareler yüksek doz anestezik kullanılarak sakrifiye edildikten sonra beyinleri hızlı bir şekilde çıkartılmış ve kuru buz üzerinde dondurulmuştur. Sonrasında, kryostat cihazı (CM1950, Leica) kullanılarak, 30 dk OSA tıkanması metodu özellikle striatum seviyesinde hasar oluşturduğu için, striatum seviyesinden 18 µm kalınlığında koronal kesitler alınmıştır. Ayrıca protein çalışmaları için 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.

Set 2 için kullanılacak fareler 30 dk OSA tıkanmasını takiben 55 gün sonra yüksek doz anesteziye alındıktan sonra farelere 0,1 M fostat tamponlu salin çözeltisi PBS kullanılarak transkardiyal perfüzyon ve sonrasında %4 PFA ile fiksasyon gerçekleştirilmiştir. Beyinler çıkartıldıktan sonra 3 saat süresince %4'lük PFA'da inkübe edilerek post fiksasyona tabi tutulmuş ve ardından %30'luk sukroz çözeltisine alınarak çökene kadar bekletilmiştir. Çöken beyinler kuru buz üzerinde dondurulduktan sonra kryostat cihazı kullanılarak striatum, red nükleus ve fasiyel nükleus seviyelerinden 18 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler ısıtıcı tabla kullanılarak 40 °C'de fikse edildikten sonra -80 °C dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Set 3 için kullanılacak fareler 30 dk OSA tıkanması takiben 55 gün reperfüzyon sonunda yüksek doz anestezik kullanılarak sakrifiye edilmiştir. Beyinler hızlı bir şekilde

çıkartılarak kuru buz üzerinde dondurulduktan sonra iskemik ve iskemik olmayan hemisferin striatum seviyelerinden doku örnekleri alınmış ve protein analizleri yapılınca kadar -80 °C dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.8. Davranış deneyleri

Davranış deneyleri İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezi'nde (MEDİTAM) bulunan davranış laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Özellikle farelerde gerçekleştirilen davranış deneyleri üzerinde ekibimizin uzun yıllar süren bir tecrübesi bulunmaktadır. Tüm davranış deneyleri uygun sıcaklık, ışık ve ses yalıtımı yapılmış özel davranış odalarında gerçekleştirilmiştir. Fareler davranış testlerine alınmadan önce yaklaşık 30 dk öncesinde davranış testlerinin yapıldığı odaya alıştırılmıştır.

3.8.1. El çekme ve kavrama gücü testi

Fonksiyonel geri kazanımın belirlenmesi için laboratuvarımızda grip strength testi uygulanmaktadır. Bu test yardımıyla hem ön iki elin hem de beyin felci sonrası etkilenen elin kavrama gücünü ölçmek için kullanılmaktadır. Kavrama gücünü ölçmek için özel olarak tasarladığımız ve ucunda üçgen bir tel bulunan Newton metre (Medio-Line Spring Scale, metric, 300 g, Pesola AG, İsviçre) kullanılmaktadır. Bu çalışmada deney dizaynında belirtilen günlerde farelerin hem çift el hem de beyin felci sonrası etkilenen sağ ellerinin (sol el medikal bant kullanılarak bağlanacaktır) kavrama gücü ölçülmüştür. Fareler kuyruklarından tutularak tele yaklaştırıldıklarında içgüdüsel olarak teli kavrayacaklardır. Kuyruklarından çekildikleri zaman teli bırakmak istemeyeceklerdir. Bırakmak zorunda kaldıkları maksimum el kavrama gücü değeri Newton cinsinden belirlenmiştir. Her test belirtilen günlerde beş tekrar olarak şekilde yapılmıştır. Beş tekrar sonrası ortalamalar hesaplanmıştır. Daha sonra operasyon öncesinde ve sonrasında alınan değerler karşılaştırılmıştır.

3.8.2. Rotarod motor koordinasyon testi

Motor koordinasyonun belirlenmesi için rotarod testi uygulanmıştır. Rotarod cihazında (Ugo Basile) ortada giderek hızlanan (4'den 40 rpm'e 245 saniyede) bir mil üzerinde farelerin kaldığı süre hesaplanmıştır. Rotarod üzerindeki mil hızlandıkça farelerin koordinasyon kurması zorlaşacaktır. Test süresi maksimum 5 dakikadır. Motor koordinasyon testi her fareye deney planında gösterilen davranış günlerinde beş tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Beş tekrar sonrası ortalamalar hesaplanmıştır. Daha sonra operasyon öncesinde ve sonrasında alınan değerler karşılaştırılmıştır.

3.8.3. Kuyruktan asma testi

Kuyruktan asma testi depresyonun belirlenmesinde kullanılan önemli bir davranış testidir. Bu testte fareler kuyruklarının yaklaşık üçte birlik bölümünden yerden 50 cm yükseklikte bulunan demir bir aparata asılmıştır. 5 dakikalık toplam test süresi boyunca farelerin hareketli ve hareketsiz kaldığı süreler belirlenmiştir. Daha sonra operasyon öncesinde ve sonrasında alınan değerler kıyaslanacak ve depresyon değerlendirilmiştir.

3.8.4. Açık/kapalı alan testi

Açık kapalı alan testi anksiyetenin belirlenmesinde kullanılan önemli bir testtir. 20 cm x 40 cm ölçülerinde yarısının üzeri kapalı olan bir kutudan oluşan testte açık ve kapalı alanlar arasında farelerin giriş çıkış yapabilecekleri bir açıklık bulunmaktadır. Fareler aydınlık alana bırakıldıktan sonra 10 dk süresince açık/kapalı alan testinde kalmışlardır. Farelerin aydınlık ve karanlık alanlarda geçirdiği süreler hesaplanmış ve anksiyete ile ilişkilendirilmiştir.

3.8.5. Açık alan testi

150 cm çapında ve 35 cm yüksekliğinde olan bir ucu kapatılmış silindir şeklinde olan davranış ünitesi kullanılacaktır. Silindir tepeden izlenen bir kamera ve Anymaze (Stoelting Co) programı yardımıyla sanal olarak üç farklı alana bölünmüştür. Bu amaçla silindir bilgisayar programı vasıtasıyla merkez, geçiş ve kenar alanları olmak üzere üç farklı alana ayrılmıştır. Her bir fare açık alan testinde 10 dk süresince kalmıştır. Daha sonra operasyon öncesinde ve sonrasında alınan değerler kıyaslanmış ve lokomotor aktivite değerlendirilmiştir.

3.8.6. Yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-Maze)

Yerden 50 cm yükseklikte, 50 cm çapında ve 5,5 cm genişliğinde olan yuvarlak platformun 90° karşılıklı olacak şekilde 15 cm yükseklikte iç ve dış duvarlarla birlikte kapalı alan denilen bölümü oluşturulmuştur. Kalan bölümler ise açık bölge olarak isimlendirilmektedir. Fareler platform üzerinde kapalı olana konulmuş ve 10 dk süresince kamera ve Anymaze bilgisayar programı vasıtasıyla gözlemlenmiştir. Hayvanlar 4 ayağı ile birlikte tamamen bir bölgeye girdiğinde kayıt yapılır. Bölgelere giriş sayısı motor aktivite ile korelasyon göstermektedir. Hayvanların korunmasız bölgelerde geçirdiği süre davranış, endişe ve korku belirtisi olarak değerlendirilmektedir. Farelerin açık ve kapalı alandaki geçirdikleri süreler değerlendirilmiştir.

3.9. İmmünofloresan boyamalar

3.9.1. NeuN boyaması ile nöronal sağkalım analizi

Striatum seviyesinden alınan beyin kesitleri oda sıcaklığında %4 PFA ile fikse edildikten sonra PFA artıklarından uzaklaşmak için 0,1 M PBS kullanılarak 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 yıkandıktan sonra bir gece süresince 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 daha sonra Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss) 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 (Beker vd., 2017; Caglayan vd., 2017).

5.9.2. 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 örnekler bloklama işlemi yapılmıştır. İnkübasyon sonunda TUNEL karışımının enzim ve substratı karıştırılarak örneklerin üzerine eklenmiştir. 37 °C'de 70 dk süresince reaksiyon gerçekleştirildikten sonra 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) 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 (Kilic vd., 2017).

3.9.3. BrdU boyaması

Set 2'deki farelerin striatum seviyelerinden alınan koronal beyin kesitlerine BrdU boyaması yapılmıştır. BrdU hücrelerin DNA'sına katıldığından dolayı yukarıda anlatılan immünofloresan yöntemlerden farklı olarak 2 N HCl vasıtasıyla DNA'nın parçalanması sağlanmıştır. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra antijen geri kazanımını sağlanması için kaynayan sitrat çözeltisinde 15 dk süresince inkübe edilmiştir. Sonrasında örnekler soğuması

için oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir. Sitrat çözeltisinin artıklarından kurtulmak için örnekler 0.1 M PBS ile yıkandıktan sonra GFAP (3656, Cell Signaling), CD31 (ab28364, Abcam) veya NeuN (MAB377C3, Merck) birincil antikorlar ile muamele edilmiştir. Antikorlar ile inkübasyon bittikten sonra örnekler PBS ile yıkanmıştır. BrdU boyaması için örnekler 1 saat süresince 2 N HCl ile inkübe edildikten sonra 1 saat süresince bloklanmıştır. Ardından, BrdU birincil antikor (ab6326, Abcam) ile inkübasyon ve uygun ikincil antikorla inkübasyon yapılmış ve hücre çekirdeğini görüntüleyebilmek için DAPI boyaması yapılmıştır. Boyama ile ilgili analizlerin yapılabilmesi için iskemik hemisferde belirlenen 24 farklı alan belirlenerek konfokal mikroskobu ile fotoğraflanmıştır. Elde edilen fotoğraflardan GFAP/BrdU, NeuN/BrdU ve CD31/BrdU immünoboyama pozitif hücreler sayılmış ve her bir grup için ortalama değerler hesaplanmıştır (Doepfner vd., 2015; Kilic vd., 2014).

3.10. Western Blot

Protein izolasyonu için farelerin iskemik striatum seviyesinden alınan doku örnekleri 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 2.0 Fluorometer cihazında (Invitrogen Life Technologies) hesaplanmıştır. Her bir örnek için 20 µg total protein lizatı, 10 µl 2X Laemmli tampon solüsyonu (161-0747, Biorad) ve geri kalanı ddH₂O olacak şekilde 20 µl hacimde numuneler hazırlanmış ve 5 dk süresince 95 °C' de kaynatıldıktan sonra buz üzerine alınmıştır.

Örnekler ve protein markeri 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), Bmal2 (sc-376287, Santa Cruz) CLOCK (5157, Cell Signaling), Anti-Per1 (ab3443, Abcam), Anti-Per2 (ab180655, Abcam), p-AKT (4060, Cell Signaling), p-Erk-1/-2 (9101, Cell Signaling), p-mTOR (5536, Cell Signaling), Brevican (610895, BD Biosciences), Ephrin B1 (sc-515264, Santa Cruz), Ephrin B2 (sc-398735, Santa Cruz), Versican (ab19345, Abcam), iNOS (sc-7271, Santa Cruz), eNOS (sc-376751, Santa Cruz) ve nNOS (sc-136006, Santa Cruz) antikorları 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 edilmiş, 5 dakika ECL Western görüntüleme solüsyonu

(1705060, Biorad) ile 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 dakika boyunca inkübasyona bırakılan membranlar inkübasyon sonunda 5 kere 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) antikor 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 (Beker vd., 2015; Kilic vd., 2017).

3.11. Proteomik analiz

3.11.1. Co-IP

Bmal1 ile etkileşime giren proteinlerin proteomik analizini gerçekleştirmek için co-IP (eş-immünopresipitasyon) yöntemi kullanılmıştır. Bmal1 anlatımı artırılan ve anlatımı susturulan örneklerden total protein izolasyonu Yöntem 5.10'da belirtildiği gibi yapılmıştır. Örneklerin manyetik boncuklara spesifik olmayan bağlanma ihtimalini ortadan kaldırmak için protein örneklerine ön temizleme yapılmıştır. Antikor bağlanmamış manyetik boncuklarla (Millipore) 20 dk oda sıcaklığında inkübe edilen hücre lizatları kullanılabildiği 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. Inkübasyonların ardından PBS ile yıkanan antikor-manyetik boncuk bileşimine önceden temizlenmiş 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 elüe edilen örneklerin konsantrasyonu Yöntem 5.10'da açıklandığı gibi Qubit yöntemiyle saptanmış ve örneklerden alınan 100 ug numune takip eden FASP protokolünde kullanılmıştır.

3.11.2. FASP protokolü

Homojenizasyon sonunda örneklerin protein seviyeleri Qubit cihazı ile belirlenmiş ve filtre yardımcı örnek hazırlama (FASP, Expedeon) için hazır kit içinden çıkan protokol takip edilmiştir. Her bir örnek için 100 μ g protein 30 μ l LC-su içerisinde hazırlanmıştır. 200 μ l üre

çözültisi ile karıştırılan örneklerin tamamı filtreli tüplere eklenerek 14,000 g'de 15 dk süresince santrifüj edilmiştir. Sonrasında tekrardan filtrenin üzerine 200 µl üre eklenerek 14,000 g'de 15 dk santrifüj tekrar edilmiştir. Sıvı kısım atıldıktan sonra filtrede kalanların üzerine 100 µl 50 mM amonyum bikarbonat eklenmiştir. Sonrasında filtre 14,000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Filtreye 75 µl tripsin solüsyonu eklenerek filtreye kısaca bir vorteks yapılmıştır. Üzeri parafilm ile kapatılan örnekler 1 dk süresince çalkalayıcıda inkübe edildikten sonra bir gece süresince 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün filtre yeni bir tüpe alınarak üzerine 40 µl 50 mM amonyum bikarbonat eklenmiştir. Sonrasında filtre tekrardan 14,000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlemi takiben filtreye 50 µl 0.5 mM Sodyum Klorit solüsyonu ilave edilerek filtre 14,000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen karışımın içerisinde gruplara ait peptit karışımları elde edilmiştir.

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

Triptik peptitler SYNAPT-G2-Si yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi ile birleştirilmiş ACQUITY UPLC M sınıfına yüklenerek hesaplanmıştır. Kolonlar %97 mobil faz A (%0,1 FA içeren UHPLC'li su) ve sıcaklık 55 °C'ye ayarlanmıştır. Peptitler analitik kolona trap kolondan (Symmetry C18, 5 µm, 180 µm i.d. × 20 mm, Waters), analitik kolona 90 dk dereceli ayrıştırma ile trap kolonundan (CSH C18, 1,7 µm, 75 µm i.d. × 250 mm, Waters) ayrıştırılmıştır. Bu ayrıştırma işlemi % 0,1 FA (h/h) içeren, gradyeni %4'den %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 µs iştir. Prekürsör iyon ön seçimi olmaksızın, 50-1900 m/z aralığındaki tüm iyonlar çözünürlük modunda parçalanması sağlanmıştır. Buna ek olarak, 100 fmol/ µl Glu-1-fibrino peptit B, 60 saniyelik bir aralıkla kilitli kütle referansı olarak verilerek peptidleri tanımlamak ve teşhis etmek için proteomik yazılım için Progenesis-QI (Waters) kullanılmıştır (Beker vd., 2017; Hacıoğlu vd., 2014; Serhatlı vd., 2014).

3.12. İstatistiksel analiz

Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi amacıyla istatistiksel analizler SPSS programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklar (Lv-Bmal1, Lv-Kontrol, Bmal1 shRNA, Kontrol shRNA, Bmal1 *knockout* ve doğal tür) SPSS programındaki tek yönlü (one-way) varyans analizi (Analysis of variance, ANOVA) kullanılarak, post-hoc testinde en düşük

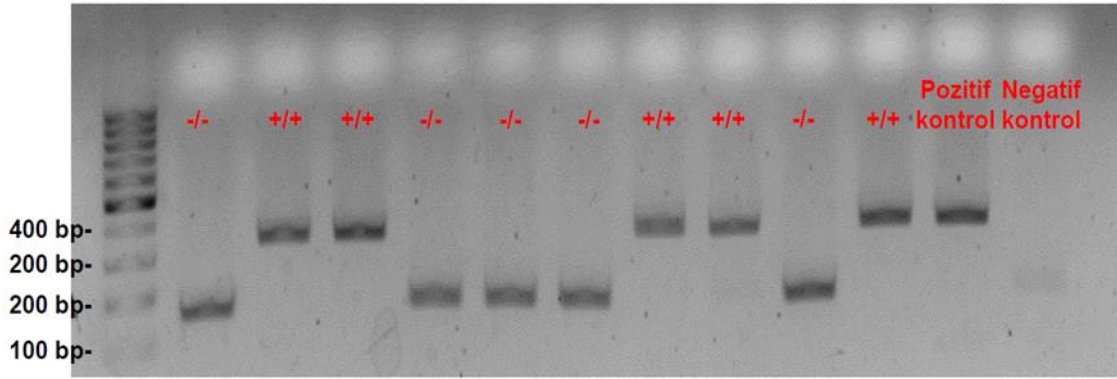
anamlı farklılık testiyle (least significant difference, LSD test) analiz edilmiştir. Grupların kendi içlerindeki istatistiksel analizler ise (Lv-Bmal1 ile Lv-Kontrol, Bmal1 shRNA ile Kontrol shRNA, Bmal1 *knockout* ile Doğal tür) bağımsız örneklem t testi (independent samples t test) kullanılarak hesaplanmıştır.

Fonksiyonel geri kazanım ile ilgili testlerde sonuçların zamana bağılı olarak değerlendirilmesi için tekrarlı ölçümler varyans analizi (repeated measurements, ANOVA) yapılmıştır. Ayrıca, LC-MS/MS verileri için anlamlılık bağımsız örneklem t testi (independent samples t test) yapılarak hesaplanmıştır. Bütün değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiş, * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir (Kilic vd., 2014).

4. BULGULAR

4.1 Deney hayvanlarının genotiplenmesi

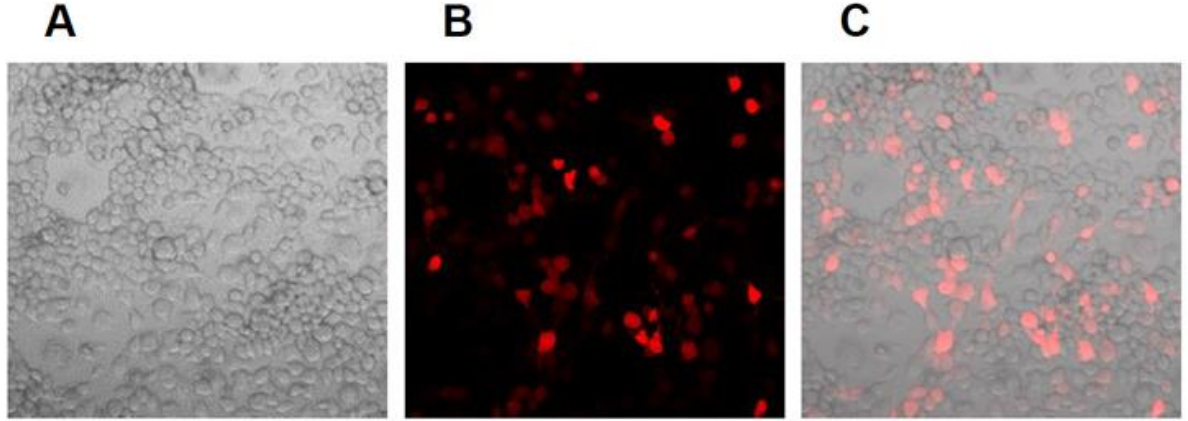
Proje kapsamında kullanılan Bmal1 transgenik farelerin (009100, Jackson Laboratoy) üretilmesi (çiftleştirilmesi) kontrollü bir şekilde ilerletilmiştir. İstenilen genotipte farelerin elde edilmesi için üretici firmanın protokollerinde de belirtildiği üzere heterozigot (Bmal1^{+/-}) fareler kendi aralarında çiftleştirilerek *knockout* (Bmal1^{-/-}) fare elde edilmiştir. Çiftleşme sonucunda elde edilen farelerin Bmal1 mutant olup olmadığını analiz edebilmek için genotipleme yapılmıştır. Bu amaçla farelerin kuyruklarından alınan örnekler projede belirtilen şekilde (Yöntem 3.3) standart polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapılmaktadır. Bmal1 mutant ve yaban tipi için ortak ileri primer 5'- GCC CAC AGT CAG ATT GAA AAG -3' kullanılmıştır. Bmal1 mutant için 5'- GCC TGA AGA ACG AGA TCA GC -3' ve doğal tür için 5'- CCC ACA TCA GCT CAT TAA CAA -3' geri primerleri kullanılarak fareler genotiplenmiş ve elde edilen Bmal1'i silinmiş fareler beyin felci operasyonları için kullanılmıştır.



Şekil 4.1.1 Bmal1 K/O genotipleme sonucu.

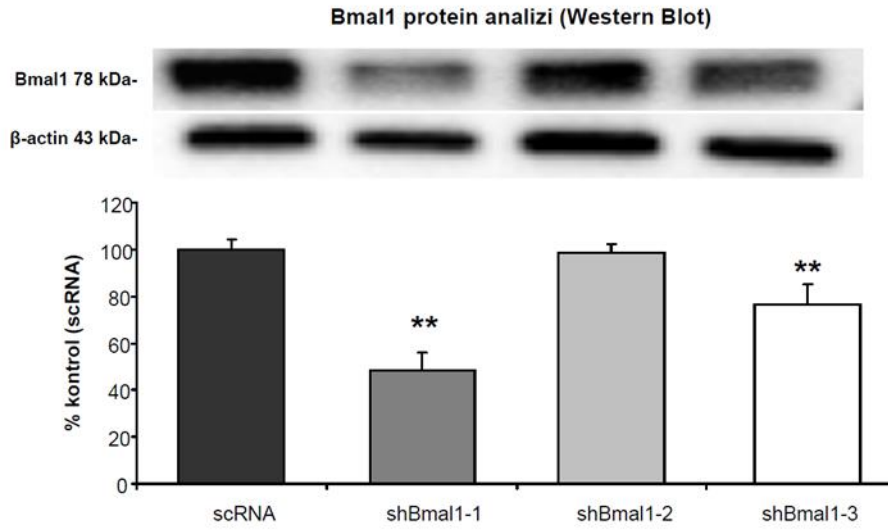
Yukarıda belirtilen genotipleme primerlerinin kullanılması neticesinde Bmal1 K/O fareler (-/-) 162 bp'da bir adet bant, heterozigot fareler (+/-) 329 bp ve 162 bp'da birer bant olmak şartıyla toplam iki bant, doğal tür (+/+) ise 329 bp'da bir adet bant vermektedir. Şekil 4.1.1'de proje kapsamında yapılan genotipleme sonucu görülmektedir. Pozitif kontrol için doğal tür DNA'sı kullanılırken, negatif kontrol için ise DNA içermeyen su örneği konulmaktadır. Bu sayede yapılan genotiplemelerin doğal türe göre kontrolü sağlanmaktadır. (Şekil 4.1.1).

4.2 Bmal1 shRNA klonlama ve virüs üretimi



Şekil 4.2.1 Lentiviral shBmal1 virüsünün hücre kültürü ortamında test edilmesi. Floresan mikroskobu kullanılarak (A) Bright-field görüntüsü ve (B) RFP+ hücre analizi, (C) Tüm fotoğrafların birleştirilmiş hali.

Şekil 4.2.1’de gösterildiği üzere lentiviral shBmal1’in etkili bir şekilde hücre kültürü ortamında hücreleri enfekte ettiği görülmektedir. Ayrıca ticari olarak satın alınan ve 3’lü set şeklinde gönderilen shRNA’lardan hangisinin Bmal1 protein seviyesini istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalttığını görebilmek için shBmal1 verilen hücrelerden Western Blot tekniği kullanılarak Bmal1 protein seviyesinin analizi yapılmıştır (Şekil 4.2.1).



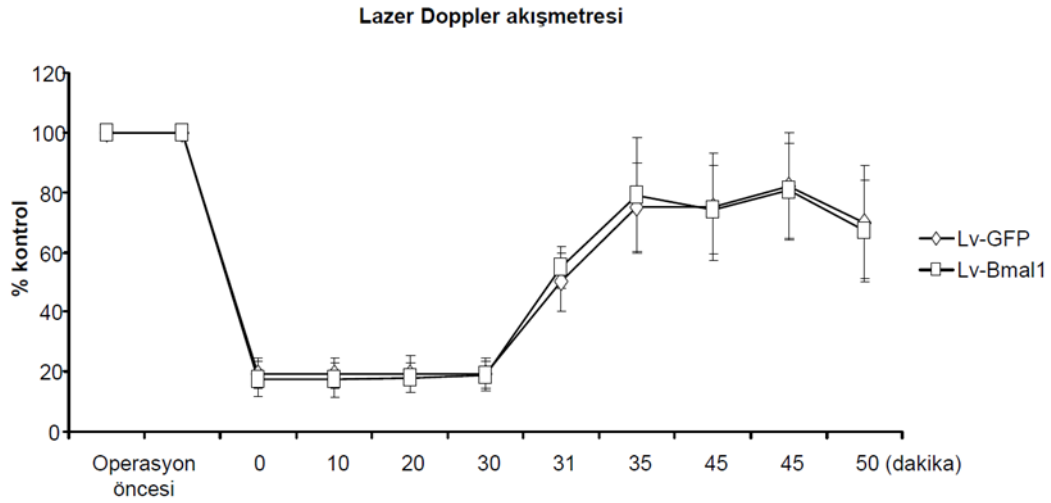
Şekil 4.2.2 Hücre kültürü ortamında shBmal1'in Bmal1 protein seviyesi üzerine olan etkilerinin Western blot tekniği ile analizi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir. ** scRNA grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0.01$).

Elde edilen sonuçlarda hem shBmal1-1 hem de shBmal1-3'ün istatistiksel olarak anlamlı ölçüde Bmal1 protein seviyesini scRNA'ya göre azalttığı gözlemlenmiştir. shBmal1-1'in Bmal1 protein seviyesini %52 oranında, shBmal1-3'ün ise %33 oranında azalttığı gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar neticesinde shBmal1-1'in en etkili seviyede Bmal1 protein seviyesini azalttığı için proje kapsamında yapılacak tüm shBmal1 ile ilgili çalışmalarda bu shRNA seçilmiştir (Şekil 4.2.2).

Üretilmiş olan Lv-Bmal1 virüsünün Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde Bmal1 protein seviyesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu sebeple sadece shBmal1 ve shBmal1'in kontrolü olarak kullanılacak olan scRNA'nın hücre kültürü ortamında Bmal1 protein seviyesi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

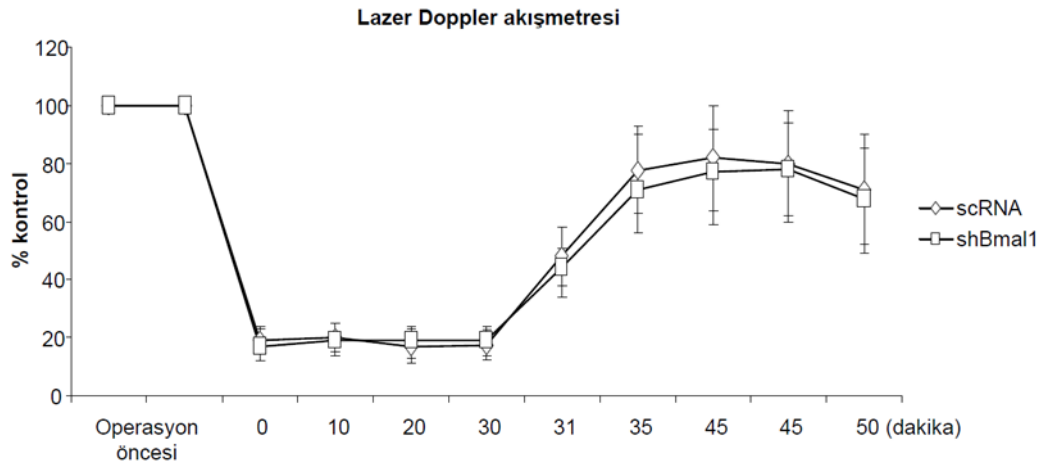
Üretilen virüslerin başarılı bir şekilde hücreleri enfekte ettiği görülmüştür ayrıca bu örneklerden toplanan hücrelerden yapılan Western blot sonucunda Bmal1 protein seviyesinin shBmal1 grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.2.2).

4.3 Beyin felci operasyonları



Şekil 4.3.1 Lazer Doppler Akışmetresi ile beyin kan akımının takibi (Lv grupları için).

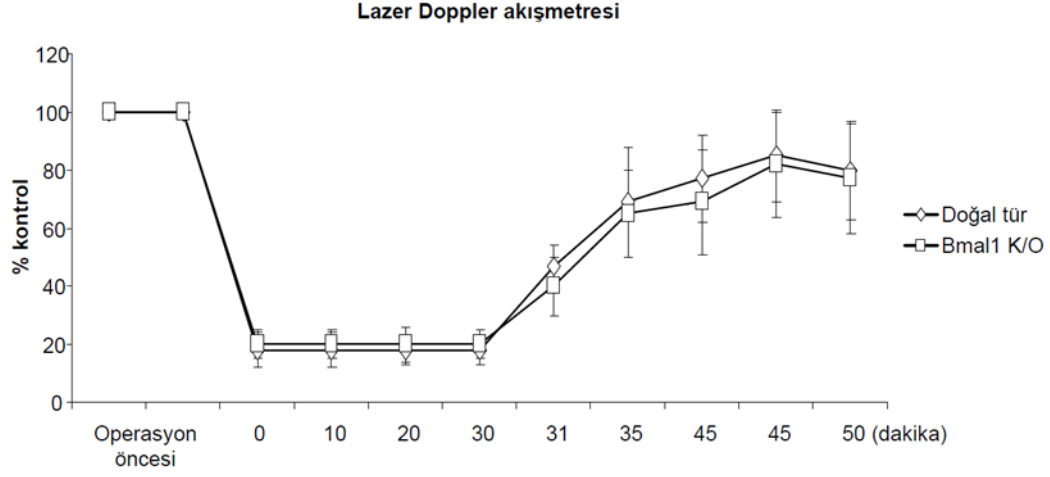
Orta serebral arterin girişinin filament yöntemiyle tıkanması sonucunda iskemik alandaki beyin kan akımı hem Lv-GFP hem de Lv-Bmal1 gruplarında yaklaşık olarak %80 oranında azalmıştır. 30 dakikalık iskemi sonrasında filamentin geri çekilmesiyle beraber bölgesel kanlanmanın tekrardan gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Beyin kan akımının incelendiği Lv-GFP ve Lv-Bmal1 deney grupları arasında hem iskemi hem de reperfüzyon süresince bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.3.1).



Şekil 4.3.2. Lazer Doppler Akışmetresi ile beyin kan akımının takibi (sh grupları için).

Orta serebral arterin girişinin filament yöntemiyle tıkanması sonucunda iskemik alandaki beyin kan akımı hem scRNA hem de shBmal1 gruplarında yaklaşık olarak %80 oranında azalmıştır. 30 dakikalık iskemi sonrasında filamentin geri çekilmesiyle beraber

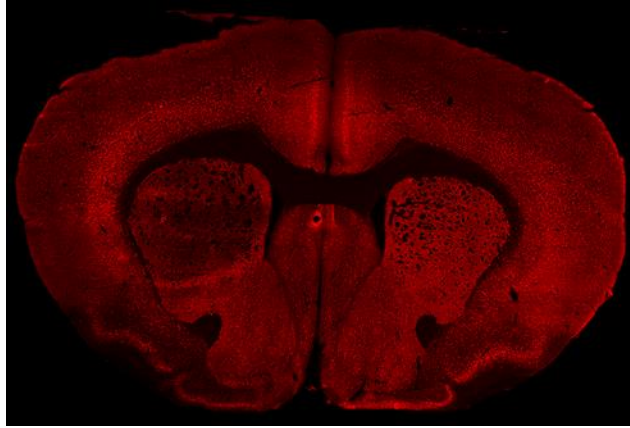
bölgesel kanlanmanın tekrardan gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Beyin kan akımının incelendiği scRNA ve shBmal1 deney grupları arasında hem iskemi hem de reperfüzyon süresince bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.3.2).



Şekil 4.3.3. Lazer Doppler Akışmetresi ile beyin kan akımının takibi (KO grupları için).

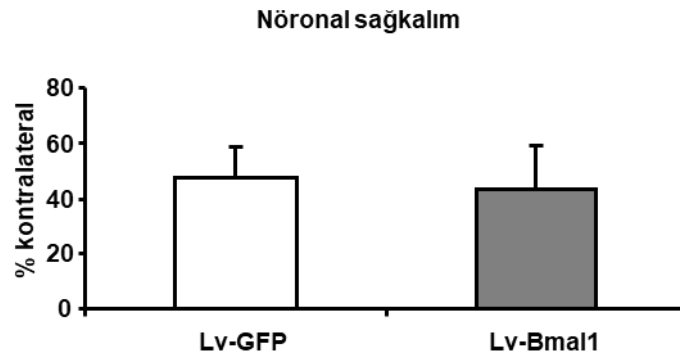
Orta serebral arterin girişinin filament yöntemiyle tıkanması sonucunda iskemik alandaki beyin kan akımı hem doğal tür hem de Bmal1 K/O (009100) gruplarında yaklaşık olarak %80 oranında azalmıştır. 30 dakikalık iskemi sonrasında filamentin geri çekilmesiyle beraber bölgesel kanlanmanın tekrardan gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Beyin kan akımının incelendiği doğal tür ve Bmal1 K/O (009100) deney grupları arasında hem iskemi hem de reperfüzyon süresince bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.3.3).

4.4 Nöronal sağkalımın belirlenmesi ve analizi



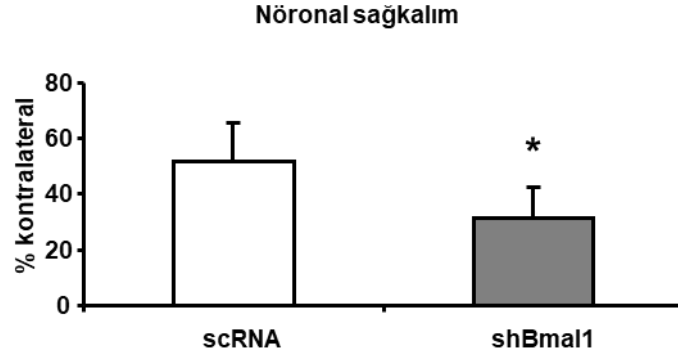
Şekil 4.4.1 30 dk beyin felci sonrası NeuN boyamasının konfokal mikroskop ile analizi

Set I deneyleri kapsamında 30 dk orta serebral arter tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon gerçekleştirilen farelerin striatum seviyesinden alınan 18 μm kalınlığındaki koronal beyin kesitlerine NeuN boyaması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 118S306 numaralı projenin yöntem kısmının 3.9.1. numaralı alt başlığında belirtildiği deneysel prosedürler izlenmiştir. İmmüno Floresan yöntemler sonrasında örnekler konfokal mikroskobu (LSM 780, Carl Zeiss) kullanılarak görüntülenmiştir. İskemik ve iskemik olmayan hemisferden belirlenen 62.500 μm^2 'lik 9 farklı alandan DAPI (çekirdek boyası) ve NeuN (nöronal işaretleyici) hücreler sayılmıştır. İskemik alanda sayılan hücrelerin iskemik olmayan hemisferdeki hücre sayısına oranlanması ile beraber nöronal sağkalım hesaplanmıştır.



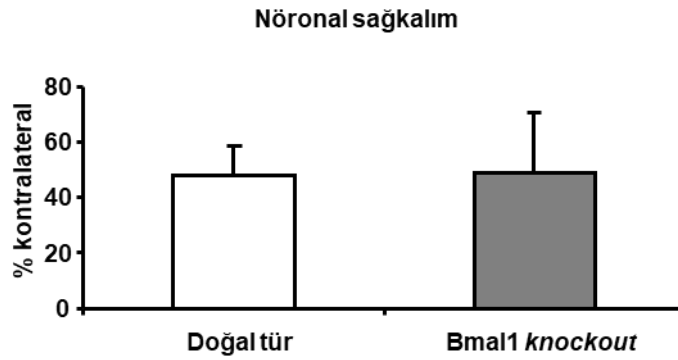
Şekil 4.4.2 Lv-GFP ve Lv-Bmal1'in beyin felci sonrasında nöronal sağkalım üzerine etkileri.

Lv-GFP grubunda nöronal sağkalım 47.2 ± 11.1 , Lv-Bmal1 grubunda 43.7 ± 15.2 olarak belirlenmiştir. İki grup arasında yapılan bağımsız örneklem t testi (independent samples t test) neticesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde bir değişimin azalmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.2).



Şekil 4.4.3 scRNA ve shBmal1'in beyin felci sonrasında nöronal sağkalım üzerine etkileri. * $p < 0.05$ scRNA grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

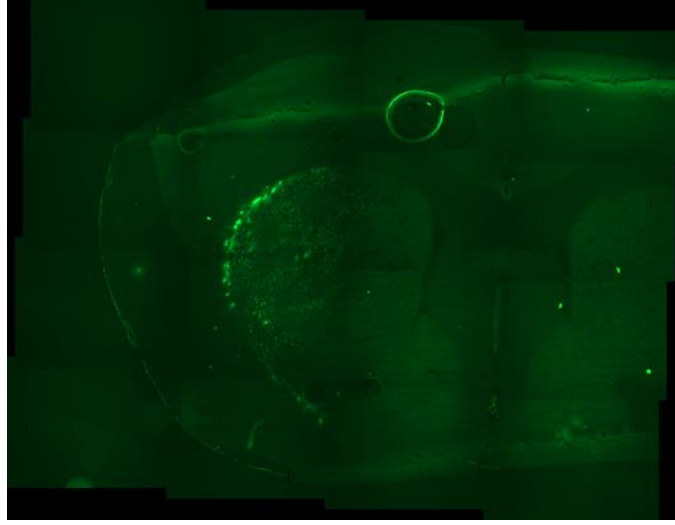
scRNA grubunda nöronal sağkalım $51,7 \pm 13,7$, shBmal1 grubunda $31,2 \pm 11,4$ olarak belirlenmiştir. İki grup arasında yapılan bağımsız örneklem t testi (independent samples t test) neticesinde Bmal1 proteininin inhibisyonu (shBmal1) beyin felci sonrasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir şekilde nöronal sağkalımın azalmasına neden olmaktadır (Şekil 4.4.3).



Şekil 4.4.4 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* farelere uygulanan beyin felci sonrasında nöronal sağkalımın analizi

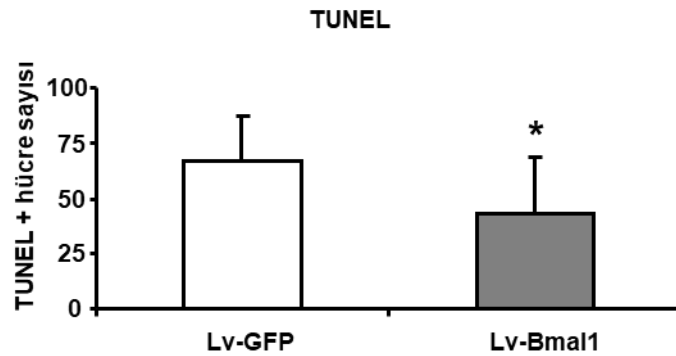
Doğal tür grubunda nöronal sağkalım $48,2 \pm 10,5$, Bmal1 *knockout* grubunda $48,9 \pm 21,7$ olarak belirlenmiştir. İki grup arasında yapılan bağımsız örneklem t testi (independent samples t test) neticesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde bir değişimin azalmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.4).

4.5 DNA fragmentasyon analizi



Şekil 4.5.1 30 dk beyin felci sonrası TUNEL boyamasının konfokal mikroskop ile analizi.

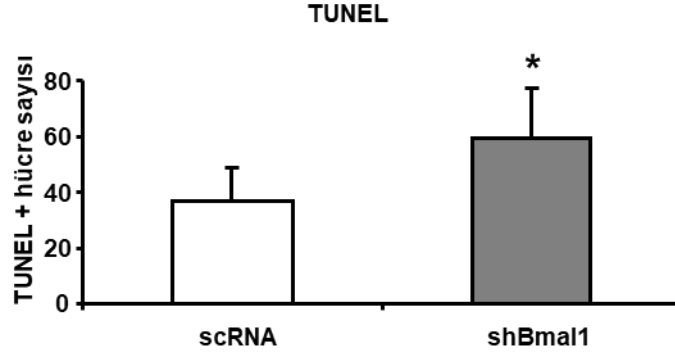
30 dk orta serebral arter tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon gerçekleştirilen farelerden alınan koronal kesitlere TUNEL boyaması yapılmıştır. 118S306 numaralı projenin yöntem bölümünün 3.9.2 numaralı alt başlığında da belirtildiği üzere terminal transferase biotinylated-dUTP Nick End Labeling (TUNEL;11684795910, Roche) kiti kullanılmıştır. Yapılan boyamalar neticesinde elde edilen örnekler konfokal mikroskobu (LSM 780, Carl Zeiss) kullanılarak görüntülenmiştir. İskemik striatum seviyesinden belirlenen $62.500 \mu\text{m}^2$ lik 9 farklı alandan DAPI (çekirdek boyası) ve TUNEL (+) (apoptotik hücre işaretleyicisi) hücreler sayılmıştır. Elde edilen veriler 9 farklı alandan sayılan TUNEL (+) ve DAPI (+) hücrelerin ortalaması alınarak aşağıdaki gibi verilmiştir (Şekil 4.5.1).



Şekil 4.5.2 Lv-GFP ve Lv-Bmal1'in beyin felci sonrasında apoptotik hücre ölümü üzerine etkileri. * $p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

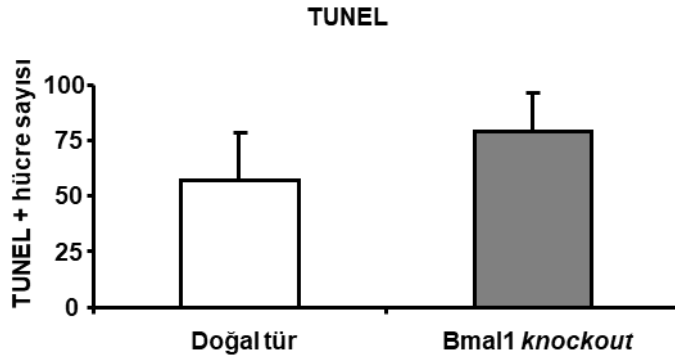
TUNEL boyaması sonrasında belirlenen ortalama apoptotik hücre sayısı Lv-GFP grubu için 66.6 ± 20.6 , Lv-Bmal1 grubu için 43.4 ± 24.8 olarak hesaplanmıştır. İki grup arasında

yapılan bağımsız örneklem t testi (independent samples t test) neticesinde Bmal1 protein seviyesi artırılmış (Lv-Bmal1) farelerde apoptotik hücre sayısının kontrol grubuna (Lv-GFP) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) seviyede daha az olduğu gözlemlenmiştir. (Şekil 4.5.2).



Şekil 4.5.3 scRNA ve shBmal1'in beyin felci sonrasında apoptotik hücre ölümü üzerine etkileri. * $p<0.05$ scRNA grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

TUNEL boyaması sonrasında ortalama apoptotik hücre sayısı scRNA grubu için 37.0 ± 11.6 , shBmal1 grubu için 59.6 ± 17.8 olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında yapılan bağımsız örneklem t testi (independent samples t test) neticesinde Bmal1 protein seviyesi azaltılmış (shBmal1) farelerde apoptotik hücre sayısının kontrol grubuna (scRNA) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) seviyede daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. (Şekil 4.5.3).



Şekil 4.5.4 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* farelere uygulanan beyin felci operasyonu sonrasında apoptotik hücre sayısının analizi.

TUNEL boyaması sonrasında belirlenen ortalama apoptotik hücre sayısı doğaltür grubu için 57.3 ± 21.0 , Bmal1 *knockout* grubu için 79.2 ± 16.5 olarak hesaplanmıştır. İki grup arasında yapılan bağımsız örneklem t testi (independent samples t test) neticesinde Bmal1 *knockout* grubunda apoptotik hücre sayısının arttığı fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$) gözlemlenmiştir. (Şekil 4.5.4).

4.6. Proteomik analizler

Beyin felci sonrasında farelerin iskemik stratum seviyesinden alınan doku örnekleri (Lv-GFP, Lv-Bmal1, scRNA, shBmal1, Bmal1 *knockout* ve doğal tür) proje önerisinin yöntem bölümü 5.11 numaralı alt başlık altında yer aldığı şekilde işlem görmüştür. Sırasıyla doku örneklerinden önce protein numunesi sonrasında ise peptitler izole edilmiştir. Elde edilen peptitler SYNAPT2-Si yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi ile birleştirilmiş ACQUITY UPLC M sınıfı cihazı aracılığıyla analiz edilmiştir. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analizi neticesinde elde edilen peptidleri tanımlamak ve teşhis etmek için Progenesis-QI (Waters) programı kullanılmıştır. Elde edilen verilerin biyoinformatik analizleri yapılmış olup Tablo 4.6.1 ve Tablo 4.6.2’de belirtilen proteinlerin Bmal1 ile direkt veya dolaylı yollardan etkileşimde olduğu görülmüştür (Tablo 4.6.1 ve 4.6.2.). Ayrıca, beyin felci sonrasında Bmal1 protein seviyesinin artmasına (Tablo 4.6.3), azalmasına (Tablo 4.6.4 ve Tablo 4.6.5) veya ortamda hiç bulunmamasına (Tablo 4.6.6, Tablo 4.6.7, Tablo 4.6.8 ve Tablo 4.6.9) göre iskemik dokuda etkilenen protein profilinin tanımlanması gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.6.1 Bmal1 ile direkt veya dolaylı yollardan etkileşimde olan proteinlerin co-IP (eş-immünopresipitasyon) proteomiks yöntemiyle belirlenmesi

Ratio	Accession	Symbol	Description	Ratio	Accession	Symbol	Description
	Q8VDM4	PSMD2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2		P08113	ENPL	Endoplasm
	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	EIF3JA	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
	P62649	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		O35737	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
	Q6ZWN5	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
	Q6ZVW3	RL10	60S ribosomal protein L10		C0HKE1	H2A1B	Histone H2A type 1-B
	P63026	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 TIM50
	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	PPIB	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

Fold change ratio
0,5  2,5

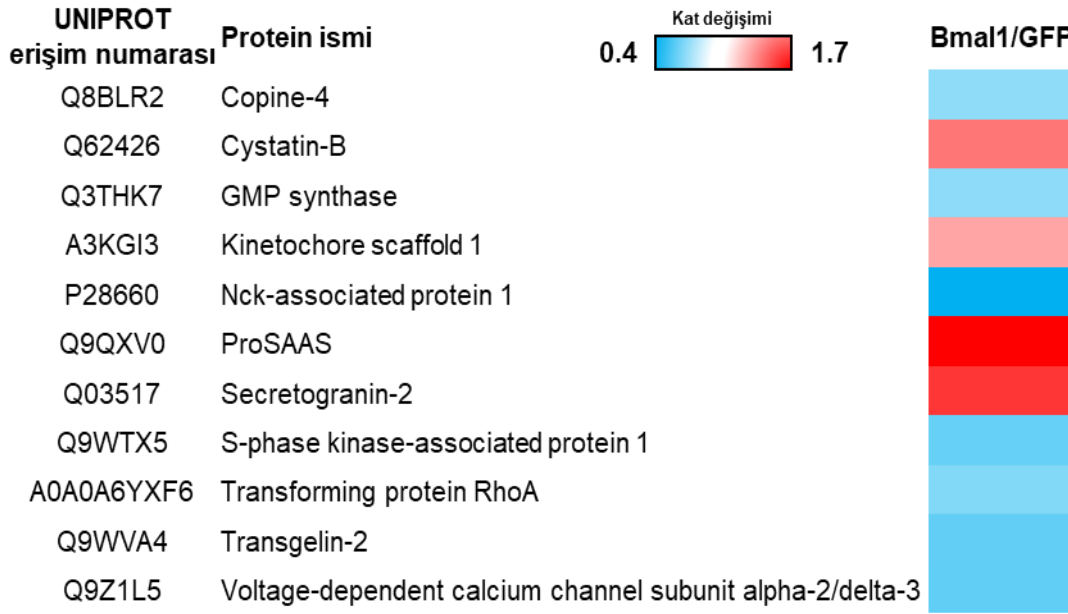
Tablo 4.6.2 Bmal1 ile direkt veya dolaylı yollardan etkileşimde olan proteinlerin co-IP (eş-immünopresipitasyon) proteomiks yöntemiyle belirlenmesi

Ratio	Accession	Symbol	Description	Ratio	Accession	Symbol	Description
	Q55142	RL35A	60S ribosomal protein L35a		P35700	PRDX1	Peroxisredoxin-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		Q35129	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	ENO4	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
	Q03285	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
	Q35887	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
	Q9JHU4	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

Fold change ratio
0,5  2,5

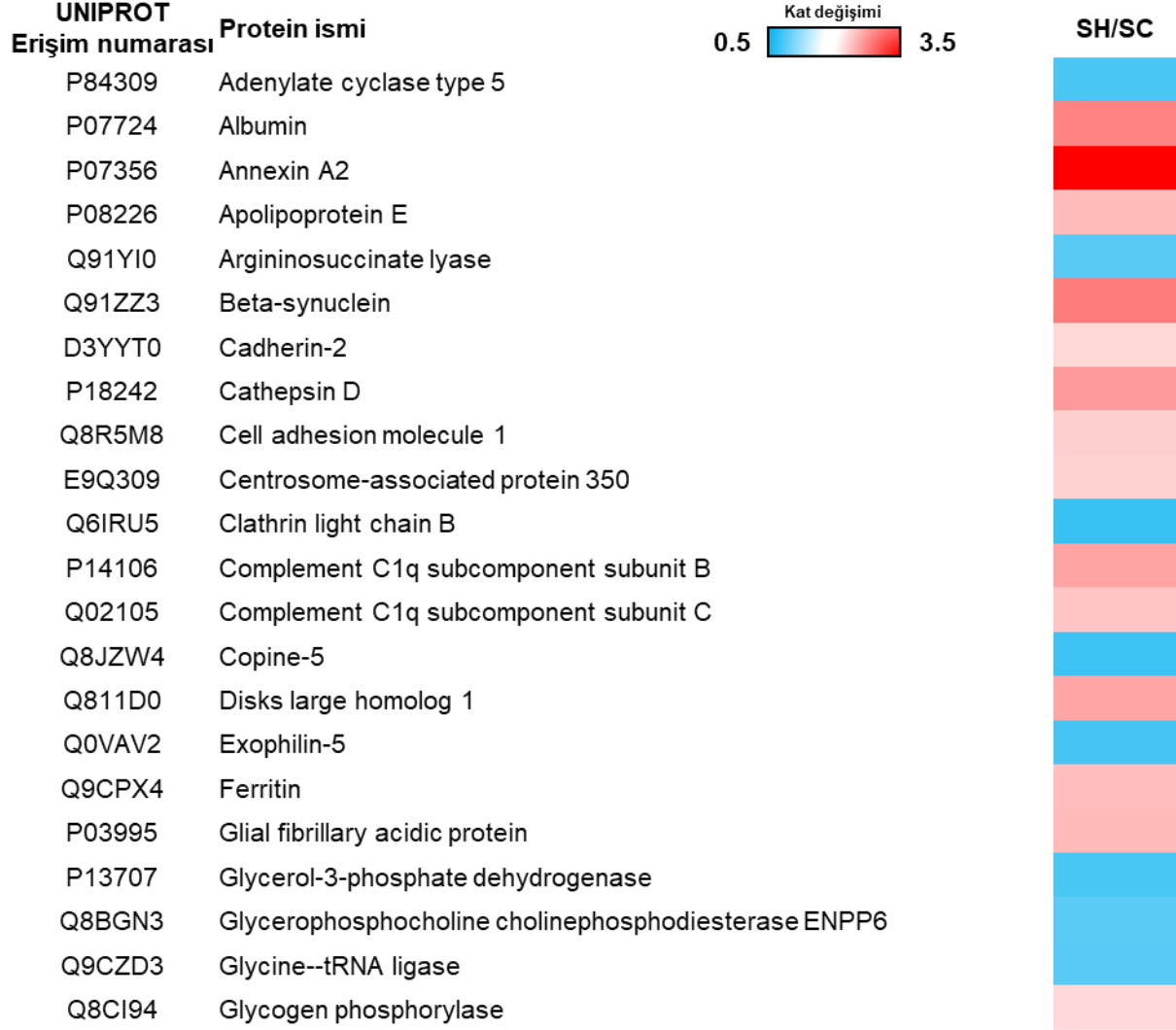
Bmal1 protein seviyesi artırılmış farelerden (Lv-Bmal1 (Bmal1)) alınan iskemik dokular ile bu grubun kontrolü olarak kullanılan Lv-GFP grubu (GFP) kıyaslandığında Tablo 1’de gösterilen 11 farklı protein seviyesinin en az 1.4 kat ve $p < 0.05$ olacak şekilde değiştiği gözlemlenmiştir ($p < 0.05$, (*independent samples t test*)).

Tablo 4.6.3 Lv-Bmal1 ve Lv-GFP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, bağımsız örneklem t-testi (*independent samples t-test*)) ve en az 1.4 kat değişim bulunan proteinlerin ısı haritası olarak gösterimi.



Bmal1 protein seviyesi azaltılmış farelerden (shBmal1 (SH)) alınan iskemik dokular ile bu grubun kontrolü olarak kullanılan scRNA (SC) grubu kıyaslandığında Tablo 2 ve Tablo 3’de gösterilen 47 farklı protein seviyesinin en az 1.4 kat ve $p < 0.05$ olacak şekilde değiştiği gözlemlenmiştir ($p < 0.05$, (*independent samples t test*)).

Tablo 4.6.4 ShBmal1 ve scRNA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, bağımsız örneklem t-testi (*independent samples t-test*)) ve en az 1.4 kat değişim bulunan proteinlerin ısı haritası olarak gösterimi.



Tablo 4.6.5 ShBmal1 ve scRNA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, bağımsız örneklem t-testi (*independent samples t-test*)) ve en az 1.4 kat değişim bulunan proteinlerin ısı haritası olarak gösterimi.

UNIPROT Erişim numarası	Protein ismi	Kat değişimi 0.5  3.5	SH/SC
Q9WUB3	Glycogen phosphorylase		
A0A075B6A3	Immunoglobulin heavy constant alpha		
A0A075B5P3	Immunoglobulin heavy constant gamma 2B		
P11881	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1		
O54983	Ketimine reductase mu-crystallin		
Q61768	Kinesin-1 heavy chain		
P34884	Macrophage migration inhibitory factor		
A0A3Q4EBU5	Na(+)/Ca(2+)-exchange protein 1		
O09111	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11		
Q8BMF3	NADP-dependent malic enzyme		
A0A1W2P7Y9	Neuronal cell adhesion molecule		
O35874	Neutral amino acid transporter A		
Q61233	Plastin-2		
A0A0R4J218	Plectin		
Q812A5	Proline-rich protein 5		
Q5DTT3	Protein TASOR 2		
Q3U741	RNA helicase		
Q9QZX7	Serine racemase		
P15508	Spectrin beta chain		
P63046	Sulfotransferase 4A1		
Q99JY0	Trifunctional enzyme subunit beta		
Q9QZM0	Ubiquilin-2		
E9Q6R3	Vesicle-trafficking protein SEC22b		
P20152	Vimentin		
B0V2H4	V-type proton ATPase subunit G		

Bmal1 protein seviyesi doğuştan hiç ifade edilmeyen farelerden (Bmal1 *knockout* (KO)) alınan iskemik dokular ile bu grubun kontrolü olarak kullanılan Doğal tür (WT) grubu kıyaslandığında Tablo 4, Tablo 5, Tablo 6 ve Tablo 7’de gösterilen 156 farklı protein seviyesinin en az 1.4 kat ve $p < 0.05$ olacak şekilde değiştiği gözlemlenmiştir ($p < 0.05$, (*independent samples t test*)).

Tablo 4.6.6 Bmal1 *knockout* (K/O) ve Doğal tür (WT) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, bağımsız örneklem t-testi (*independent samples t-test*)) ve en az 1.4 kat değişim bulunan proteinlerin ısı haritası olarak gösterimi.

UNIPROT Erişim numarası	Protein ismi	0.1	Kat değişimi	7	KO/WT
P68510	14-3-3 protein eta				
P16330	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase				
Q3TXS7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1				
P63276	40S ribosomal protein S17				
P62082	40S ribosomal protein S7				
P61922	4-aminobutyrate aminotransferase				
P63038	60 kDa heat shock protein, mitochondrial				
Q9CXW4	60S ribosomal protein L11				
Q9DCD0	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating				
P21836	Acetylcholinesterase				
G3XA25	Acetyl-CoA acetyltransferase				
P11031	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15				
Q8BK64	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1				
Q8BGA8	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM5				
P56376	Acylphosphatase-1				
P84309	Adenylate cyclase type 5				
P40124	Adenylyl cyclase-associated protein 1				
P84078	ADP-ribosylation factor 1				
D3YVF0	A-kinase anchor protein 5				
P28474	Alcohol dehydrogenase class-3				
Q9CZS1	Aldehyde dehydrogenase X				
Q91VB8	Alpha globin 1				
Q7TPR4	Alpha-actinin-1				
Q9JI91	Alpha-actinin-2				
P46660	Alpha-internexin				
O55042	Alpha-synuclein				
A7E1Z5	Anion exchange protein				
Q5SVG4	AP complex subunit beta				
E9PY16	ArfGAP with dual PH domains 1				
Q6PA06	Atlastin-2				
Q9CQQ7	ATP synthase F(0) complex subunit B1				
Q9DCX2	ATP synthase subunit d				
Q91V92	ATP-citrate synthase				
P04919	Band 3 anion transport protein				
A8DUK4	Beta-globin				
P15116	Cadherin-2				
P12658	Calbindin				
P11798	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha				
Q9QXX4	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2				

Tablo 4.6.7 Bmal1 *knockout* (K/O) ve Doğal tür (WT) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, bağımsız örneklem t-testi (*independent samples t-test*)) ve en az 1.4 kat değişim bulunan proteinlerin ısı haritası olarak gösterimi.

UNIPROT Erişim numarası	Protein ismi	0.1	Kat değişimi	7	KO/WT
P35564	Calnexin				
Q8CCS7	Calretinin				
P05132	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha				
A0A0A6YX73	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit				
P31324	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit				
Q8K354	Carbonyl reductase [NADPH] 3				
Q5M8N0	CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1				
A2AMH4	Choline transporter-like protein 1				
Q08EB5	CLIP-associating protein 2				
Q9CQI6	Coactosin-like protein				
P98086	Complement C1q subcomponent subunit A				
P49615	Cyclin-dependent-like kinase 5				
Q9CZ13	Cytochrome b-c1 complex subunit 1				
P19783	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1				
P43024	Cytochrome c oxidase subunit 6A1				
Q9D0M3	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial				
F6ZX84	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1				
Q9R0P5	Destrin				
Q9EQF6	Dihydropyrimidinase-related protein 5				
G3X922	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13				
O54734	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit				
P31938	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1				
O08788	Dynactin subunit 1				
Q8C845	EF-hand domain-containing protein D2				
Q99LC5	Electron transfer flavoprotein subunit alpha				
Q8C522	Endonuclease domain-containing 1 protein				
Q8CHT1	Ephexin-1				
P56564	Excitatory amino acid transporter 1				
Q6P5F9	Exportin-1				
Q9ERK4	Exportin-2				
P26040	Ezrin				
Q3UHL6	Fibronectin				
P48320	Glutamate decarboxylase 2				
Q99JP7	Glutathione hydrolase 7				
E9PVM7	Glutathione S-transferase				
P51855	Glutathione synthetase				
V9GXA7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase				
Q66L47	Guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating, olfactory type				
Q3UGR5	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2				

Tablo 4.6.8 Bmal1 *knockout* (K/O) ve Doğal tür (WT) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, bağımsız örneklem t-testi (*independent samples t-test*)) ve en az 1.4 kat değişim bulunan proteinlerin ısı haritası olarak gösterimi.

UNIPROT Erişim numarası	Protein ismi	Kat değişimi 0.1  7	KO/WT
P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2		
P02088	Hemoglobin subunit beta-1		
P02089	Hemoglobin subunit beta-2		
P17710	Hexokinase-1		
O08528	Hexokinase-2		
Q8BGZ1	Hippocalcin-like protein 4		
P38060	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase		
P70404	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma 1		
O54983	Ketimine reductase mu-crystallin		
P24527	Leukotriene A-4 hydrolase		
Q3TYE5	Limbic system-associated membrane protein		
Q61166	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1		
Q9CZW5	Mitochondrial import receptor subunit TOM70		
P04370	Myelin basic protein		
P60202	Myelin proteolipid protein		
P20917	Myelin-associated glycoprotein		
Q61885	Myelin-oligodendrocyte glycoprotein		
A6H603	NACHT domain- and WD repeat-containing protein 1		
Q99KE1	NAD-dependent malic enzyme		
Q8VDQ8	NAD-dependent protein deacetylase		
P03893	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2		
P03911	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4		
P03921	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5		
Q8BMF3	NADP-dependent malic enzyme		
P19246	Neurofilament heavy polypeptide		
P08551	Neurofilament light polypeptide		
P08553	Neurofilament medium polypeptide		
Q8BYM5	Neuroigin-3		
P06837	Neuromodulin		
Q8BNY6	Neuronal calcium sensor 1		
Q5SSP3	Neutral amino acid transporter A		
Q8BLF1	Neutral cholesterol ester hydrolase 1		
S4R2L3	NK-tumor recognition protein		
Q91ZP9	N-terminal EF-hand calcium-binding protein 2		
Q8C0E9	PH and SEC7 domain-containing protein 3		
S4R1R0	PHD finger protein 24		
P70182	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma		
F6RJE8	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 alpha		
Q922S4	Phosphodiesterase		

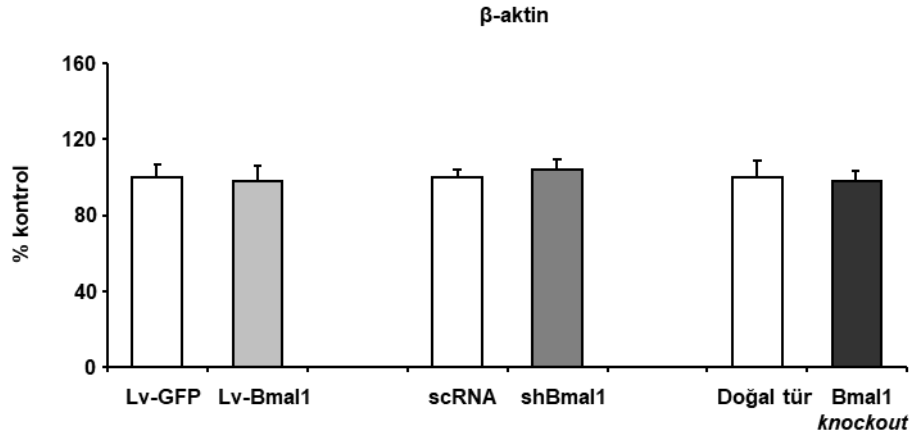
Tablo 4.6.9 Bmal1 *knockout* (K/O) ve Doğal tür (WT) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, bağımsız örneklem t-testi (*independent samples t-test*)) ve en az 1.4 kat değişim bulunan proteinlerin ısı haritası olarak gösterimi.

UNIPROT Erişim numarası	Protein ismi	0.1	Kat değişimi	7	KO/WT
Q9D5W0	Phosphodiesterase				
S4R197	Phosphodiesterase				
B2RQA1	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 1				
Q9JI46	Predicted gene				
Q8C419	Probable G-protein coupled receptor 158				
E9Q1J7	Propionyl-CoA carboxylase beta chain				
Q8BKE0	Proteasome subunit alpha type-2				
Q8BI08	Protein MAL2				
Q60829	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B				
B1B0B8	Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin				
A2ALS7	Rap1 GTPase-activating protein 1				
Q9CXS2	Ras-related protein Rab-3C				
Q9JIW9	Ras-related protein Ral-A				
P84096	Rho-related GTP-binding protein RhoG				
Q8R127	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase				
Q9R1T4	Septin-6				
Q9CWU3	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform				
Q7TNL5	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit				
P62715	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha				
Q99JR1	Sideroflexin-1				
Q68FG2	Spectrin beta chain				
Q9QWI6	SRC kinase-signaling inhibitor 1				
Q64332	Synapsin-2				
Q8BG39	Synaptic vesicle glycoprotein 2B				
Q62465	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog				
Q80TB8	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog-like				
F6VR28	Synaptophysin				
Q8BYI9	Tenascin-R				
Q5SRX1	TOM1-like protein 2				
E9Q8T1	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2				
Q8BMS1	Trifunctional enzyme subunit alpha				
Q9JJK7	Tropomodulin-2				
P24529	Tyrosine 3-monooxygenase				
P62984	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40				
Q99PL6	UBX domain-containing protein 6				
B0QZN5	Vesicle-associated membrane protein 2				
Q8CBE3	WD repeat-containing protein 37				
Q8R5H6	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1				
P56695	Wolframin				

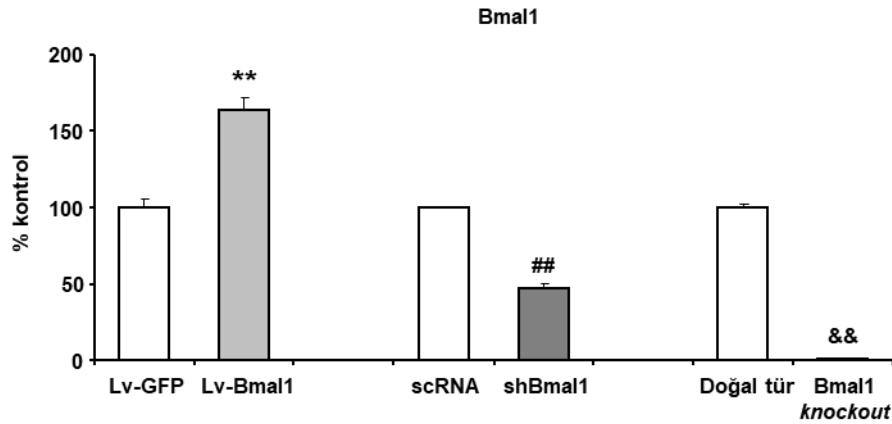
30 dk orta serebral arter tıkanması takiben 55 gün reperfüzyon gerçekleştirilen farelerin iskemik striatum seviyesinden alınan doku örneklerinden LC-MS/MS aracılı proteomik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu sayede literatürde ilk defa Bmal1 protein ifade artışının, azalışının veya Bmal1 protein ifadesinin ortamda hiç olmadığı durumda beyin felci sonrası değişen protein profili analizi yapılmıştır. Elde edilen proteinlerin sonraki çalışmalara yön vereceğini düşünmekteyiz.

4.7. Western Blot aracılı protein analizi

30 dk orta serebral arter tıkanması takiben 72 saat reperfüzyon gerçekleştirilen farelerden alınan iskemik dokular bir araya getirildikten sonra proje önerisinin yöntem bölümünde bulunan 5.10 numaralı başlık altında yer alan deneysel prosedürler izlenerek protein analizleri gerçekleştirilmiştir. Lv-Bmal1 grubu Lv-GFP grubuna göre, shBmal1 grubu scRNA grubuna göre, Bmal1 *knockout* grubu doğal türe göre oranlanarak gösterilmiştir.



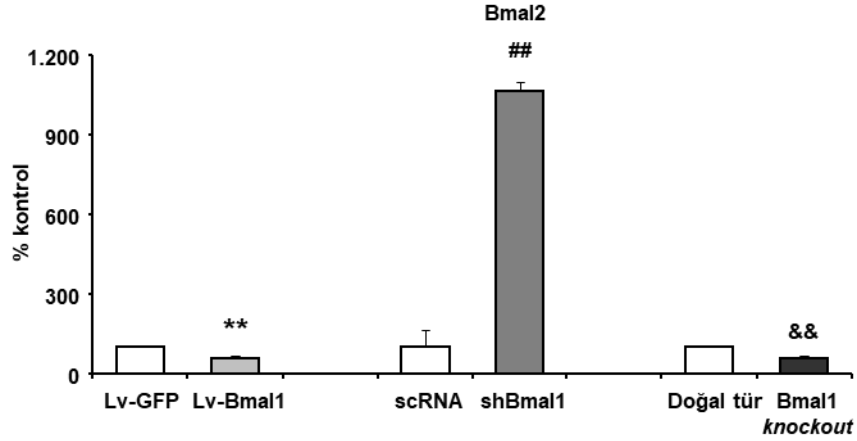
Şekil 4.7.1 β-aktin protein seviyesi analizi.



Şekil 4.7.2 Bmal1 protein seviyesi analizi. **p<0.01/ *p<0.05 Lv-GFP grubuna göre, ##p<0.01/ #p<0.05 scRNA grubuna göre, &&p<0.01/ &p<0.05 LDoğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

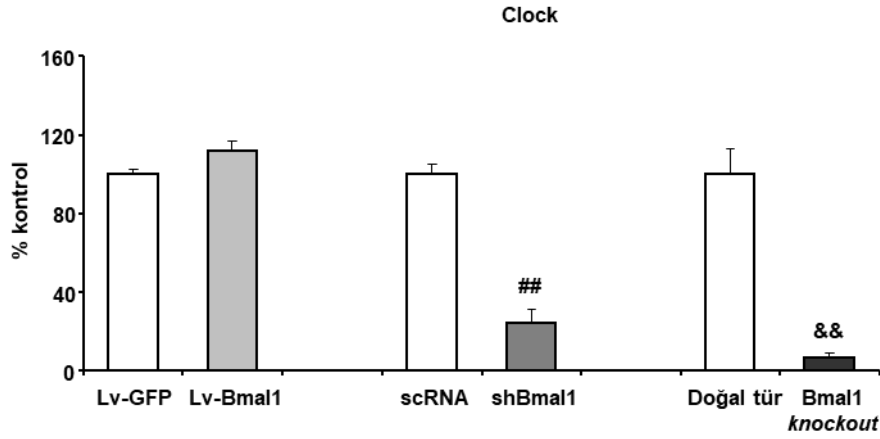
Beyin felci sonrasında Bmal1 protein seviyesi Lv-GFP grubunda 100 ± 5.8 , Lv-Bmal1 grubunda 163 ± 8.9 olarak ölçülmüştür. Bmal1 protein seviyesi lentiviral vektörler kullanılarak istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$, (independent samples t test) bir şekilde artırıldığı beyin felci sonrasında da gösterilmiştir. scRNA grubunda Bmal1 protein seviyesi 100 ± 2 , shBmal1 grubunda 47 ± 3.8 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Bmal1 gen dizisini hedef alan shBmal1 grubunun istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$, (independent samples t test) bir şekilde Bmal1 protein seviyesini iskemi sonrasında da düşürdüğünü göstermiştir. Ek olarak doğal

türün Bmal1 protein seviyesi 100 ± 2.1 olarak hesaplanmış olup Bmal1 *knockout* grubunda Bmal1 protein seviyesi ölçülememiştir. Elde edilen bu sonuç vasıtasıyla iskemi öncesinde genotipleme vasıtasıyla mutant olduğu belirlenen farelerde Bmal1 protein anlatımının olmadığı gösterilmiştir ($p < 0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.7.2).



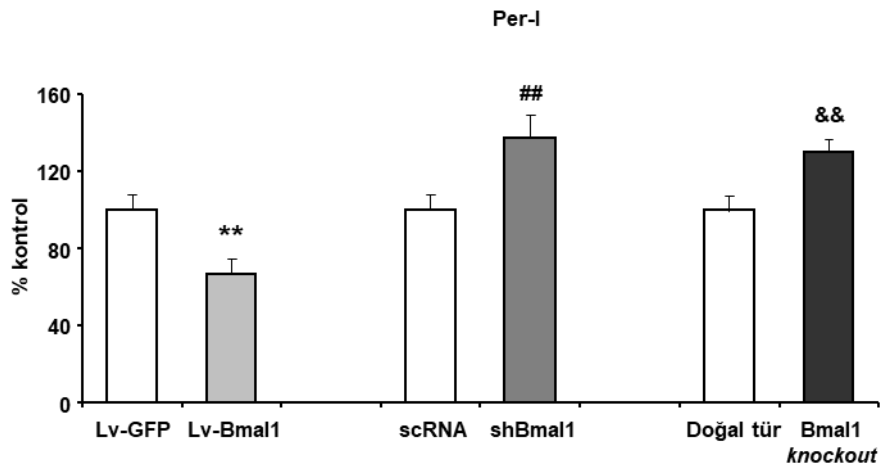
Şekil 4.7.3 Bmal2 protein seviyesi analizi. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre, ## $p < 0.01$ / # $p < 0.05$ scRNA grubuna göre, && $p < 0.01$ / & $p < 0.05$ LDoğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

Beyin felci sonrasında Bmal2 protein seviyesi Lv-GFP grubunda 100 ± 7.8 , Lv-Bmal1 grubunda 57 ± 8.9 olarak ölçülmüştür. İki deney grubu arasında yapılan istatistiksel analizler neticesinde Bmal1 protein seviyesi artırılmış farelerde Bmal2 protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test) bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. scRNA deney grubunda Bmal2 protein seviyesi 100 ± 62.1 olarak ölçülmüş olup shBmal1 grubunda 1064 ± 32.3 olarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler neticesinde Bmal1 protein anlatım ifadesi baskılanmış shBmal1 grubunda Bmal2 protein seviyesinin yaklaşık olarak 10 kat olacak şekilde arttırdığı görülmüştür. İki deney grubu arasında yapılan istatistiksel analizler neticesinde bu artışın istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test) olduğu gözlemlenmiştir. Doğal tür grubunda Bmal2 protein seviyesi 100 ± 6.8 , Bmal1 *knockout* grubunda 58 ± 7.8 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde Bmal1 *knockout* farelerde iskemi sonrasında Bmal2 protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test) bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7.3).



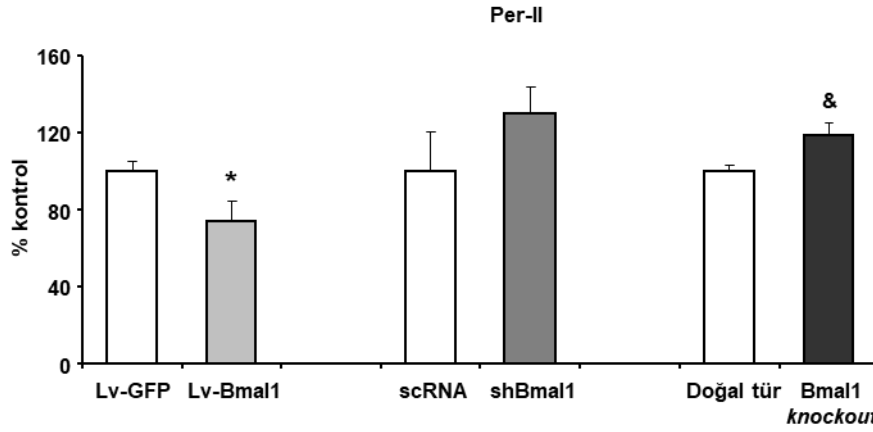
Şekil 4.7.4 Clock protein seviyesinin analizi. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre, ### $p < 0.01$ / # $p < 0.05$ scRNA grubuna göre, && $p < 0.01$ / & $p < 0.05$ Doğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

Bmal1 ile heterodimer partner olarak görev alan Clock protein seviyesi analiz edildiğinde Lv-GFP grubunda Clock protein seviyesi 100 ± 2.2 , Lv-Bmal1 grubunda ise 112 ± 4.6 olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında bir artış olmasına rağmen bu değişim istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildir ($p > 0.05$, (independent samples t test)). scRNA grubunda Clock protein seviyesi 100 ± 5.7 , shBmal1 grubunda ise 24 ± 6.9 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler shBmal1 grubunda Bmal1 protein seviyesindeki azalış ile aynı paralellikte Clock protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test)) bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Doğal tür grubunda 100 ± 12.9 , Bmal1 *knockout* grubunda 7 ± 2.4 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Bmal1 protein seviyesine bağlı şekilde Clock proteininin Bmal1 *knockout* grubunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test)) bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7.4).



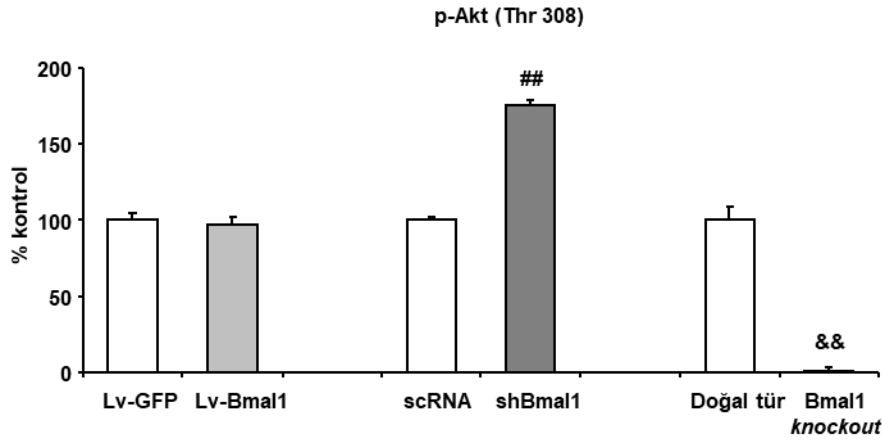
Şekil 4.7.5 Period-1 (Per-I) protein seviyesi analizi. ** $p < 0.01$ Lv-GFP grubuna göre, ## $p < 0.01$ scRNA grubuna göre, && $p < 0.01$ Doğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

Per-I protein seviyesi Lv-GFP grubunda 100 ± 6.1 , Lv-Bmal1 grubunda 68 ± 7.1 olarak ölçülmüştür. İki grup arasında yapılan istatistiksel analizde Bmal1 protein seviyesi arttırılmış Lv-Bmal1 grubunda Per-II protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test) bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. scRNA grubunda Per II protein seviyesi 100 ± 12.3 , shBmal1 gurubunda ise 147 ± 17.1 olarak ölçülmüştür. Bmal1 protein seviyesi azaltılmış shBmal1 grubunda Per-II protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ($p < 0.05$, (independent samples t test) tespit edilmiştir. Doğal tür grubunda Per-II protein seviyesi 100 ± 3.2 , Bmal1 *knockout* grubunda ise 130.7 ± 4.9 olarak hesaplanmıştır. Bmal1 protein anlatımı bulunmayan Bmal1 *knockout* grubunda Per-II protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test) ölçüde arttığı görülmüştür.



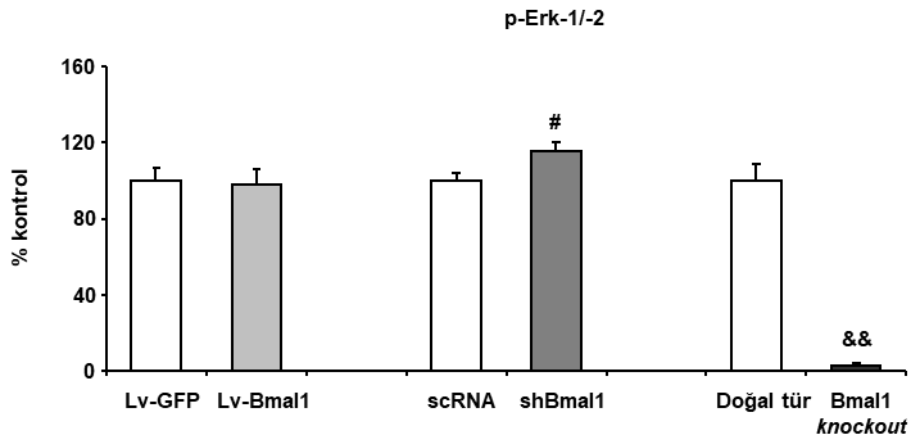
Şekil 4.7.6 Per-II protein seviyesinin analizi. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre, ## $p < 0.01$ / # $p < 0.05$ scRNA grubuna göre, && $p < 0.01$ / & $p < 0.05$ LDoğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

Per-II protein seviyesi Lv-GFP grubunda 100 ± 5.6 , Lv-Bmal1 grubunda 75 ± 10.1 olarak ölçülmüştür. İki grup arasında yapılan istatistiksel analizde Bmal1 protein seviyesi arttırılmış Lv-Bmal1 grubunda Per-II protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test) bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. scRNA grubunda PerII protein seviyesi 100 ± 20.6 , shBmal1 gurubunda ise 130 ± 14 olarak ölçülmüştür. Bmal1 protein seviyesi azaltılmış shBmal1 grubunda Per-II protein seviyesinin arttığı fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p > 0.05$, (independent samples t test) tespit edilmiştir. Doğal tür grubunda Per-II protein seviyesi 100 ± 4 , Bmal1 *knockout* grubunda ise 119 ± 6.6 olarak hesaplanmıştır. Bmal1 protein anlatımı bulunmayan Bmal1 *knockout* grubunda Per-II protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test) ölçüde arttığı görülmüştür (Şekil 4.7.6).



Şekil 4.7.7 p-Akt protein seviyesinin analizi. **p<0.01/ *p<0.05 Lv-GFP grubuna göre, ##p<0.01/ #p<0.05 scRNA grubuna göre, &&p<0.01/ &p<0.05 LDoğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

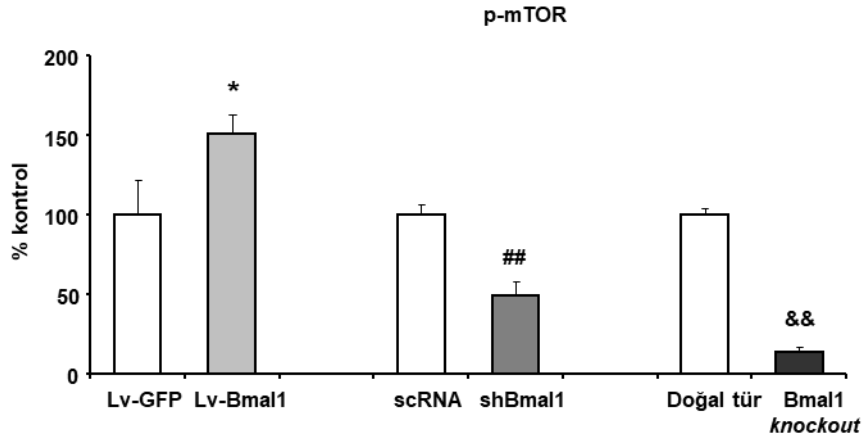
Hücre sağ kalımında önemli bir rolü bulunan p-Akt protein seviyesine bakıldığında Lv-GFP grubunda 100 ± 4.8 , Lv-Bmal1 grubunda 97 ± 5.8 olarak ölçülmüştür. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde bir değişim gözlemlenmemiştir. scRNA grubunda p-Akt protein seviyesi 100 ± 2.5 , shBmal1 deney grubunda ise 176 ± 3.1 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu veriler Bmal1 protein seviyesinin baskılanmasına bağlı olarak iskemik beyin felci sonrasında p-Akt protein seviyesi shBmal1 grubunda istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$, (independent samples t test) ölçüde arttığı gösterilmiştir. Doğal tür grubunda p-Akt protein seviyesi 100 ± 8.8 , Bmal1 *knockout* grubunda ise p-Akt protein seviyesi tespit edilememiştir (Şekil 4.7.7).



Şekil 4.7.8 p-Erk-1/-2 protein seviyesinin analizi. **p<0.01/ *p<0.05 Lv-GFP grubuna göre, ##p<0.01/ #p<0.05 scRNA grubuna göre, &&p<0.01/ &p<0.05 LDoğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

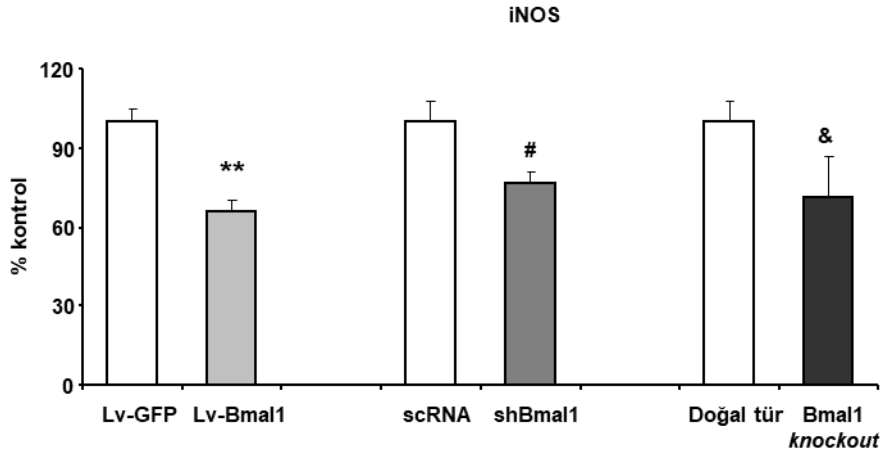
Sağkalım kinazı olarak da bilinen p-Erk-1/-2 protein seviyesi analiz edildiğinde Lv-GFP grubunda 100 ± 6.8 , Lv-Bmal1 grubunda 97 ± 8.6 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen veriler Bmal1 protein seviyesinin artışına bağlı olarak iskemik beyin felci sonrasında p-Erk-1/-2

protein seviyesinin değişmediği görülmüştür. scRNA grubunda p-Erk-1/-2 protein seviyesi 100 ± 3.8 , shBmal1 grubunda 115 ± 5.5 oranında olduğu görülmüştür. İki grup arasında yapılan istatistiksel analizler neticesinde Bmal1 protein seviyesi azaltılmış (shBmal1) farelerde beyin felci sonrasında p-Erk-1/-2 protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test) bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Doğal tür grubunda p-Erk-1/-2 protein seviyesi 100 ± 8.7 , Bmal1 *knockout* grubunda ise p-Erk-1/-2 protein seviyesi tespit edilememiştir (Şekil 4.7.8).



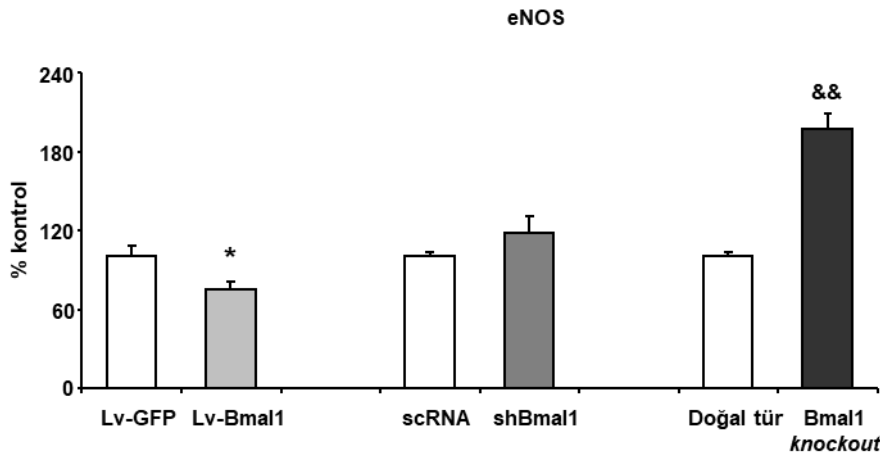
Şekil 4.7.9 p-mTOR protein seviyesinin analizi. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre, ### $p < 0.01$ / # $p < 0.05$ scRNA grubuna göre, && $p < 0.01$ / & $p < 0.05$ Doğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

p-mTOR seviyesinin analize bakıldığında Lv-GFP grubunda 100 ± 22.1 , Lv-Bmal1 grubunda 151 ± 12.5 olduğu görülmüştür. Bu veriler neticesinde Bmal1 protein seviyesinin arttırıldığı Lv-Bmal1 grubunda mTOR protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test) bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. scRNA deney grubunda p-mTOR protein seviyesi 100 ± 6.9 , shBmal1 deney grubunda ise 49 ± 8.8 oranında bulunduğu gösterilmiştir. Bmal1 protein seviyesinin azaltılmasına bağlı olarak iskemik beyin felci sonrasında m-TOR protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test) bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Ek olarak doğal tür grubunda p-mTOR protein seviyesi 100 ± 4.2 , Bmal1 *knockout* deney grubunda ise 14 ± 2.7 seviyesinde olduğu gösterilmiştir. Elde edilen bu veriler neticesinde shBmal1 deney grubu ile aynı paralellikte Bmal1 *knockout* deney grubunda p-mTOR protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test) bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7.9).



Şekil 4.7.10 iNOS protein seviyesinin analizi. **p<0.01/ *p<0.05 Lv-GFP grubuna göre, ##p<0.01/ #p<0.05 scRNA grubuna göre, &p<0.01/ &p<0.05 LDoğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

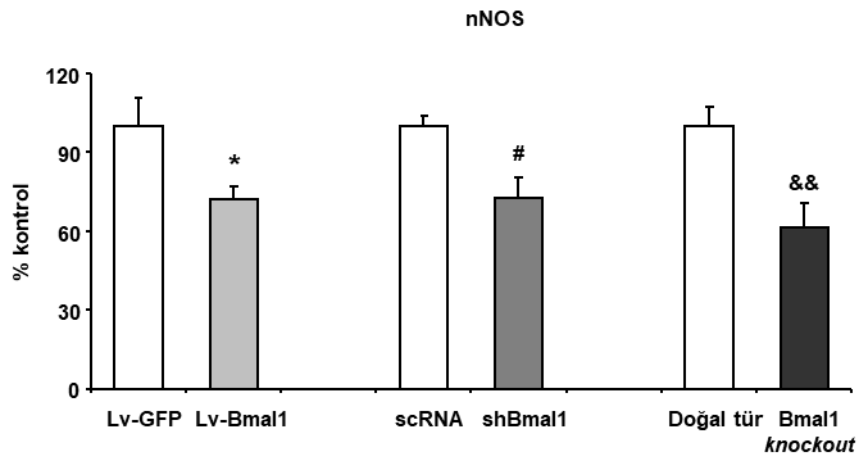
İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) protein seviyesinin analizine bakıldığında Lv-GFP grubunda 100 ± 5.1 , Lv-Bmal1 grubunda ise 66 ± 4.4 olduğu gösterilmiştir. scRNA deney grubunda 100 ± 7.9 , shBmal1 grubunda 77 ± 4 oranında olduğu, doğal tür grubunda 100 ± 7.9 ve Bmal1 *knockout* deney grubunda 71 ± 15.3 oranında bulunduğu gösterilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde Bmal1 protein seviyesinin arttırılması, azaltılması veya ortamda hiç ifade edilmeyişine bağlı olarak iNOS protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$, (independent samples t test) bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. İlgili sonuç proje ekibi olarak dikkatimizi çekmiş olup elde edilen sonucun bir başka markaya ait antikor ile tekrar edilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.7.10).



Şekil 4.7.11 eNOS protein seviyesinin analizi. **p<0.01/ *p<0.05 Lv-GFP grubuna göre, ##p<0.01/ #p<0.05 scRNA grubuna göre, &p<0.01/ &p<0.05 LDoğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

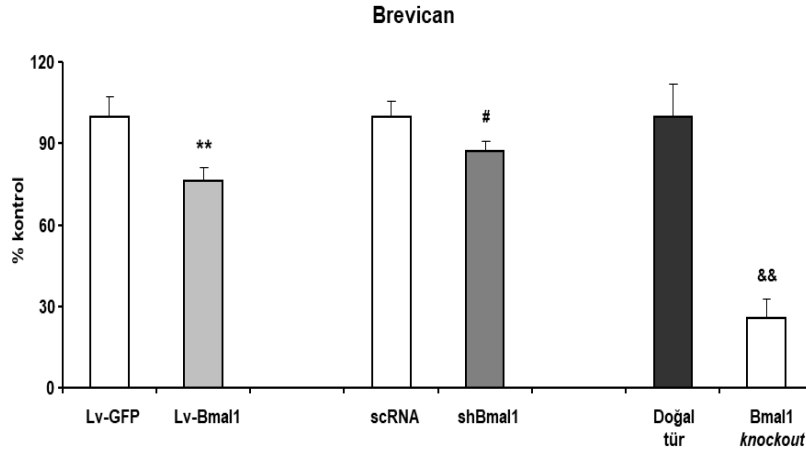
Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS) protein seviyesi Lv-GFP deney grubunda 100 ± 7.6 , Lv-Bmal1 deney grubunda 75 ± 6.4 olarak hesaplanmıştır. Bmal1 protein seviyesi

arttırılmasına bağı olarak eNOS protein seviyesinin beyin felci sonrasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test) bir şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir. scRNA grubunda eNOS protein seviyesi 100 ± 2.5 , shBmal1 deney grubunda 117 ± 13.2 olarak hesaplanmıştır. shBmal1 deney grubunda eNOS seviyesi artmaktadır fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$, (independent samples t test). Ek olarak doğal tür için eNOS protein seviyesi 100 ± 3.6 , Bmal1 *knockout* grubunda ise 197 ± 11.9 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler dahilinde Bmal1 protein seviyesi olmayan farelerde iskemi sonrasında eNOS protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test) bir şekilde arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.7.11).



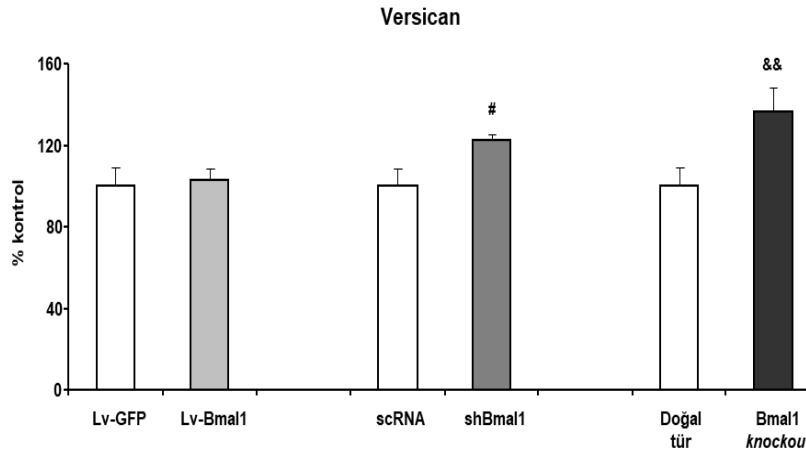
Şekil 4.7.12 nNOS protein seviyesinin analizi. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre, ### $p < 0.01$ / # $p < 0.05$ scRNA grubuna göre, && $p < 0.01$ / & $p < 0.05$ LDoğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS) protein seviyesi Lv-GFP deney grubunda 100 ± 10.6 , Lv-Bmal1 deney grubunda 72 ± 4.9 , scRNA grubunda 100 ± 3.7 , shBmal1 grubunda 72 ± 8.4 , doğal tür grubunda 100 ± 7.1 ve Bmal1 *knockout* grubunda 61 ± 9.6 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler dahilinde yapılan istatistiksel analizler Bmal1 protein seviyesinin artışına, azalışına veya ortamda hiç olmamasına bağı olarak istatistiksel olarak anlamlı seviyede nNOS protein seviyesinin azaldığını göstermektedir. İlgili sonuç proje ekibi olarak dikkatimizi çekmiş olup elde edilen sonucun bir başka markaya ait antikor ile tekrar edilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.7.12).



Şekil 4.7.13 Brevican protein seviyesi analizi. ** $p < 0.01$ Lv-GFP grubuna göre, # $p < 0.05$ scRNA grubuna göre, && $p < 0.01$ Doğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

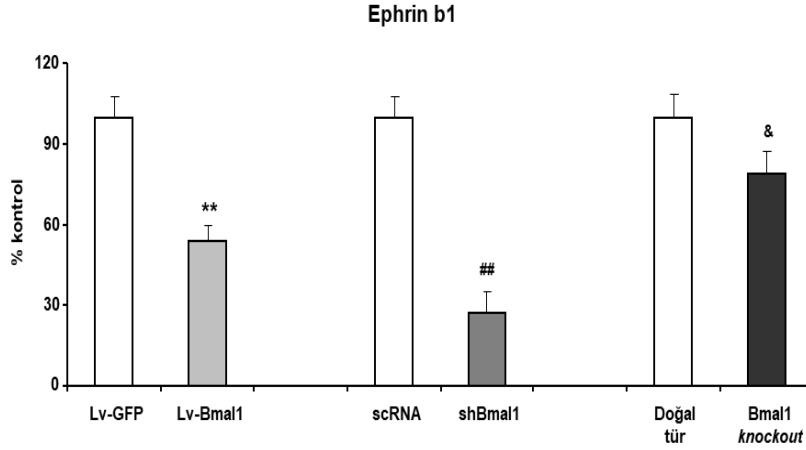
Brevican beyinde bulunan birçok fizyolojik ve patofizyolojik süreçte önemli rolü bulunan bir nöral proteoglikandır. Nöronal yüzeylere lokalize olabilen brevican aynı zamanda patofizyolojik süreçler sonrasında plastisite üzerine de önemli katkıları bulunur. Proje kapsamında 30 dk beyin felci sonrasında 55 gün reperfüzyon gerçekleştirilen farelerin iskemik striatum seviyesinden brevican protein seviyesi analiz edilmiştir. Aksonal yönelmeyi sağlayan Brevican seviyesi Bmal1'in protein ifadesinin artırılmasına, azaltılmasına veya ortamda hiç bulunmamasına bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmaktadır ($p < 0.05$, (independent samples t test). Elde edilen bulgular Bmal1'in beyin felci sonrasında aksonal yönelmede önemli bir rolünün göstergesi olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.7.14 Versican protein seviyesi analizi. # $p < 0.05$ scRNA grubuna göre, && $p < 0.01$ Doğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

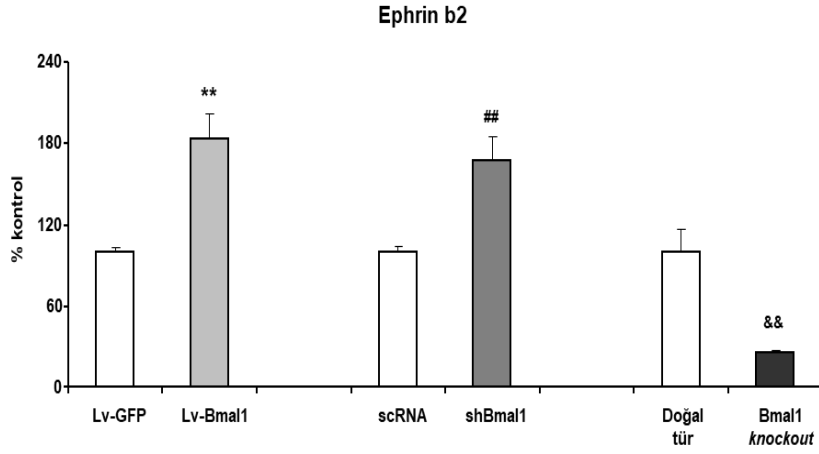
Versican kondroitin sülfat proteoglikanları olarak bilinmektedir ve özellikle doğum sonrasında beyindeki sinaptik bağlantıların stabilize edilmesine yardımcı olur. Ayrıca yaralanmalar sonrasında aksonal onarım mekanizmaları üzerine inhibe edici bir özelliği

bulunarak rejenerasyonu engellediği düşünülmektedir. Beyin felci sonrası 55. günde alınan iskemik dokulardan yapılan Versican analizine göre Bmal1 protein seviyesinin artmasına bağlı olarak versican protein seviyesinde önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Fakat Bmal1 protein seviyesinin lentiviral vektörler aracılığıyla inhibe edilmesi (shBmal1) veya Bmal1 protein anlatımının hiç olmaması (Bmal1 *knockout*) Versican protein seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmaktadır (independent samples t test).



Şekil 4.7.15 Ephrin b1 protein seviyesi analizi. ** $p < 0.01$ Lv-GFP grubuna göre, ## $p < 0.01$ scRNA grubuna göre, & $p < 0.05$ Doğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

Membrana bağlı proteinler olarak bilinen ephrin proteinleri ve bunların reseptörleri olan Ephrin reseptör tirozin kinazlar, merkezi sinir sisteminin gelişimi sırasındaki anahtar rolleriyle bilinir. Reseptör aktivasyonu veya uyarımı, hem reseptörde hem de ligand taşıyan hücrelerde çift yönlü olarak gerçekleşebilir. Eph reseptörü ve ephrin aileleri, olgun beyindeki sinaptik plastisitede rol oynamaktadır. Aksonal plastiside önemli rolü bulunan Ephrin b1 seviyesi Bmal1'in protein ifadesinin artırılmasına, azaltılmasına veya ortamda hiç bulunmamasına bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmaktadır ($p < 0.05$, (independent samples t test). Elde edilen bulgular Bmal1'in beyin felci sonrasında aksonal yönlenmede önemli bir rolünün göstergesi olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.7.16 Ephrin b2 protein seviyesi analizi. ** $p < 0.01$ Lv-GFP grubuna göre, ## $p < 0.05$ scRNA grubuna göre, && $p < 0.01$ Doğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

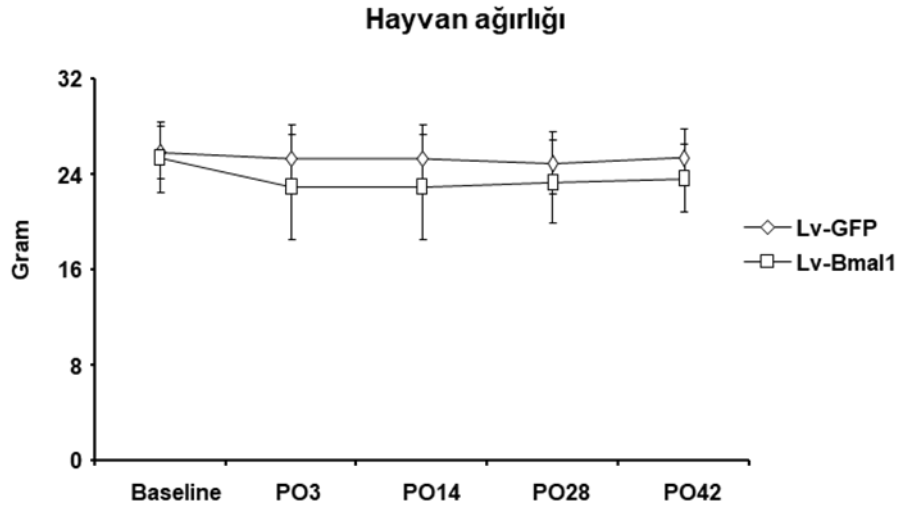
Bmal1 protein seviyesinin artmasına veya lentiviral vektörler aracılığıyla azaltılmasına bağlı olarak Ephrin b2 protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı fakat Bmal1 protein seviyesinin ortamda hiç bulunmadığı durumlarda ise ephrin b2 protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldığı gösterilmiştir ($p < 0.05$, (independent samples t test)).

4.8. Davranış Deneyleri

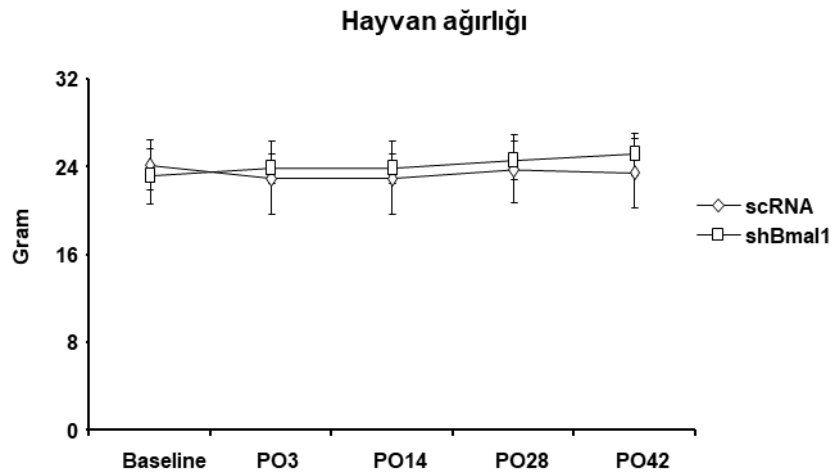
Davranış deneyleri İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezi'nde (MEDİTAM) bulunan davranış laboratuvarlarında ve projenin yöntem 3.8 numaralı alt başlıkta yer aldığı şekliyle gerçekleştirilmiştir.

4.8.1 Hayvan ağırlığı

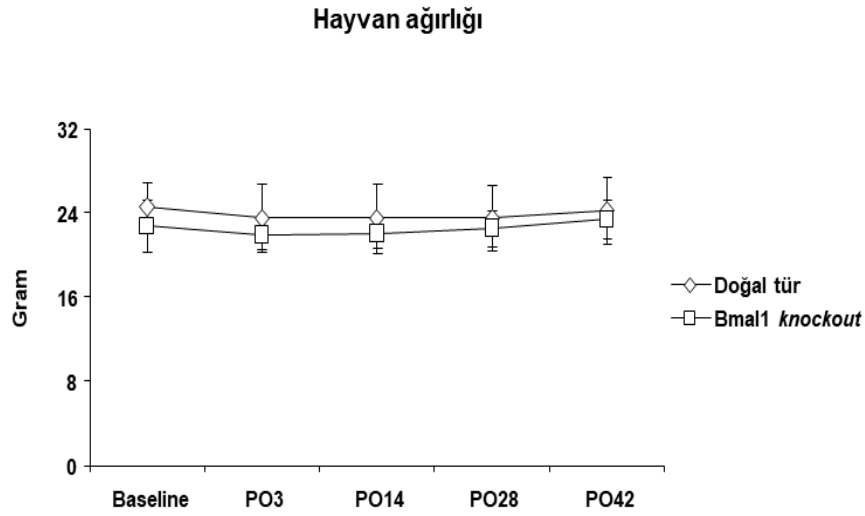
118S306 numaralı proje kapsamında yapılan davranış deneyleri süresince deney hayvanlarının ağırlıkları davranış deneylerinin yapılacağı günlerde ölçülmüş olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı veya hayvan refahını azaltacak bir ağırlık kaybının yaşanmadığı gösterilmiştir. (Şekil 4.8.1.1-3).



Şekil 4.8.1.1 Davranış deneyleri süresince Lv-GFP ve Lv-Bmal1 deney grubundaki farelerin ağırlıklarının takibi.

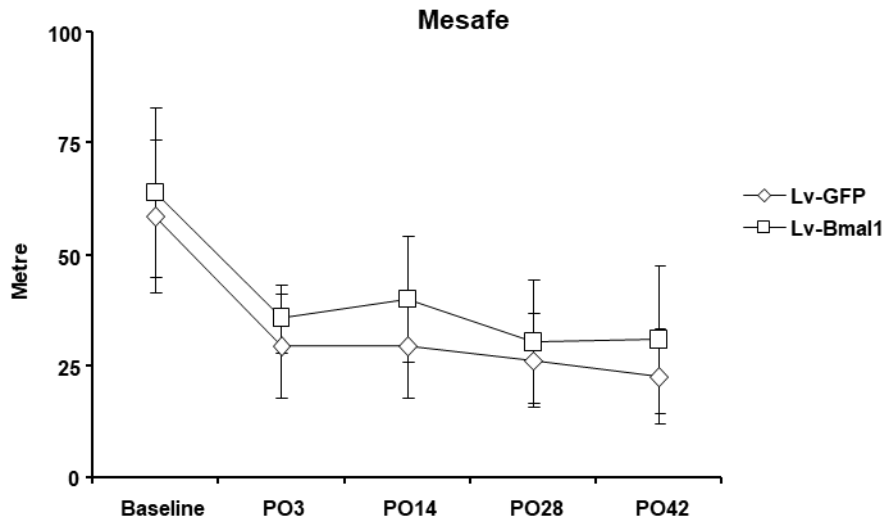


Şekil 4.8.1.2 Davranış deneyleri süresince scRNA ve shBmal1 deney grubundaki farelerin ağırlıklarının takibi.



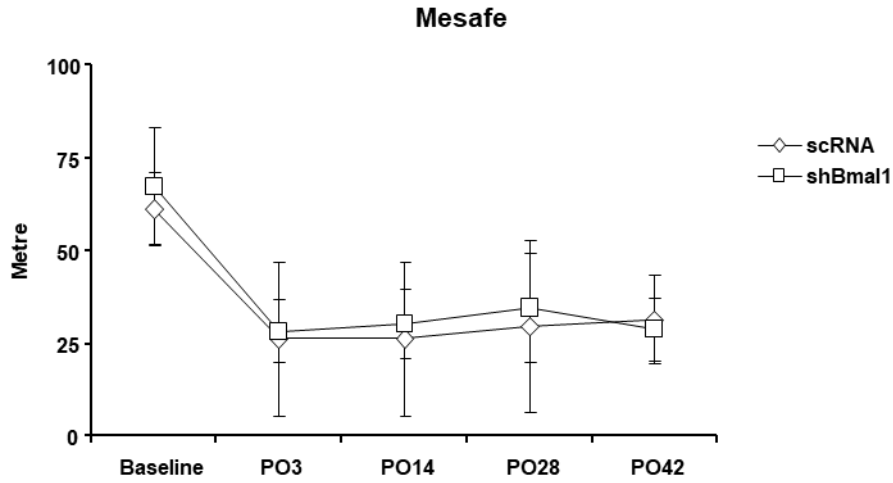
Şekil 4.8.1.3 Davranış deneyleri süresince Doğal tür ve Bmal1 *knockout* deney grubundaki farelerin ağırlıklarının takibi.

4.8.2 Açık alan testi



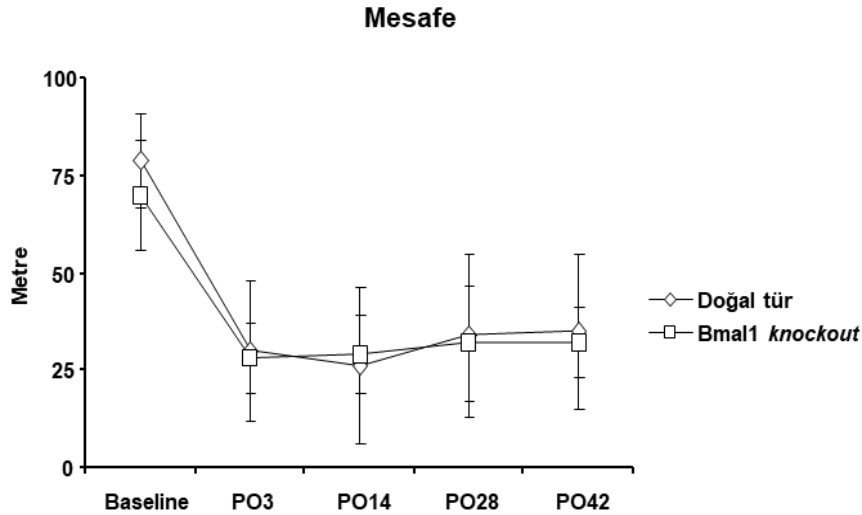
Şekil 4.8.2.1 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde kat ettikleri mesafe.

Lv-GFP ve Lv-Bmal1 deney gruplarında beyin felcinin indüklenmesi ile beraber PO3 gününde her iki grupta da kat ettikleri mesafeler azalmıştır. PO14, PO28 ve PO42. günlerde tekrarlanan testlerde gruplar arasında herhangi bir istatistiksel değişim gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.1).



Şekil 4.8.2.2 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde kat ettikleri mesafe.

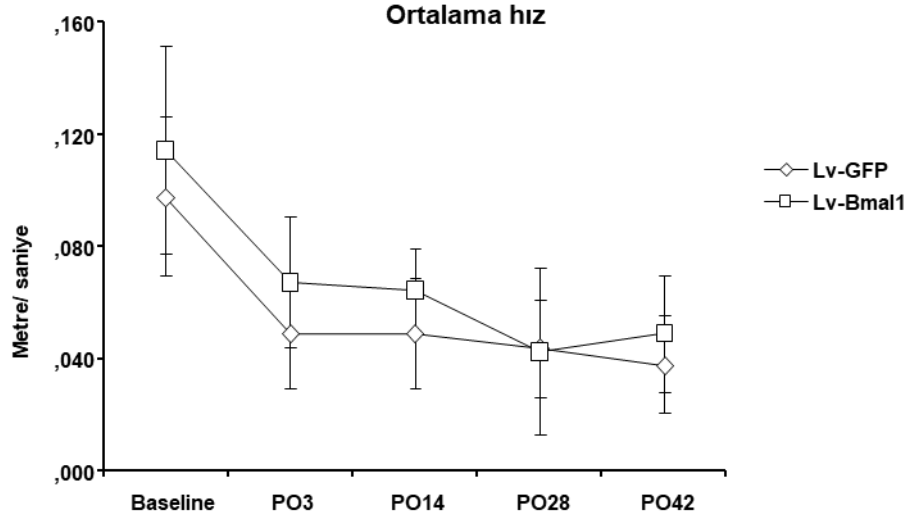
scRNA ve shBmal1 deney gruplarında beyin felcinin indüklenmesi ile beraber PO3 gününde her iki grupta da kat ettikleri mesafeler azalmıştır. PO14, PO28 ve PO42. günlerde tekrarlanan testlerde gruplar arasında herhangi bir istatistiksel değişim gözlemlenmemiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.2).



Şekil 4.8.2.3 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde kat ettikleri mesafe.

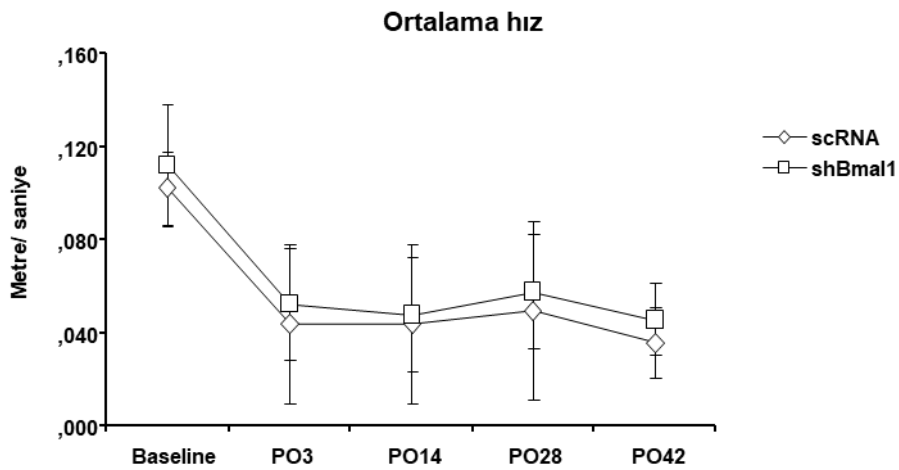
Beyin felci operasyonlarından önce normal fizyolojik koşullar altında alınan ölçümlerde Bmal1 *knockout* grubundaki farelerin açık alan testinde kat ettikleri mesafe doğal tür grubuna göre daha az olduğu gözlemlenmiştir. Fakat bu farklılık istatistiksel olarak bir anlamlılık taşımamaktadır. Beyin felcinin indüklenmesi ile beraber PO3 gününde her iki grupta da kat ettikleri mesafeler azalmıştır. PO14, PO28 ve PO42. günlerde tekrarlanan testlerde gruplar

arasında herhangi bir istatistiksel değişim gözlemlenmemiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.3).



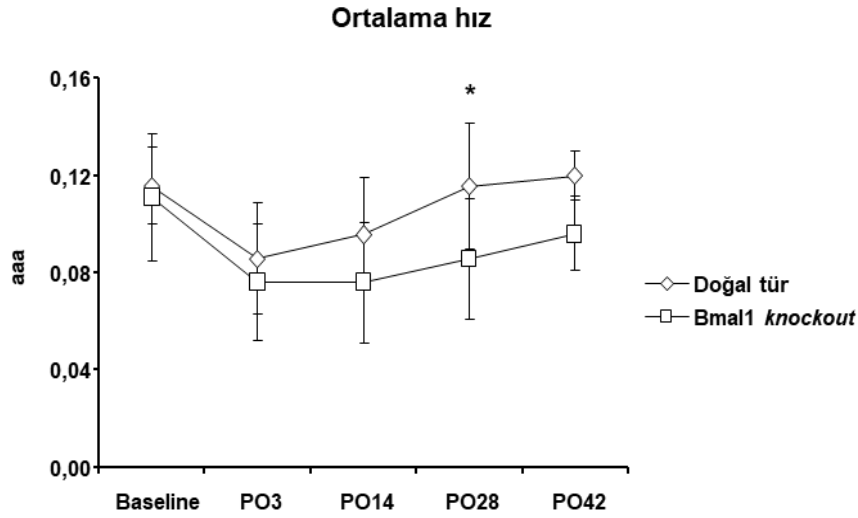
Şekil 4.8.2.4 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde ortalama hızları.

Lv-GFP ve Lv-Bmal1 deney gruplarında beyin felcinin indüklenmesi ile beraber PO3 gününde her iki grupta da ortalama hızlarının azaldığı görülmüştür. Açık alan testinin tekrarlandığı PO3 ve PO14 ve PO42. günlerde Lv-Bmal1 grubunda bulunan farelerin ortalama hızlarının Lv-GFP grubuna kıyasla arttığı fakat bu artışın istatistiksel olarak bir anlamlılığının olmadığı görülmüştür ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.4).



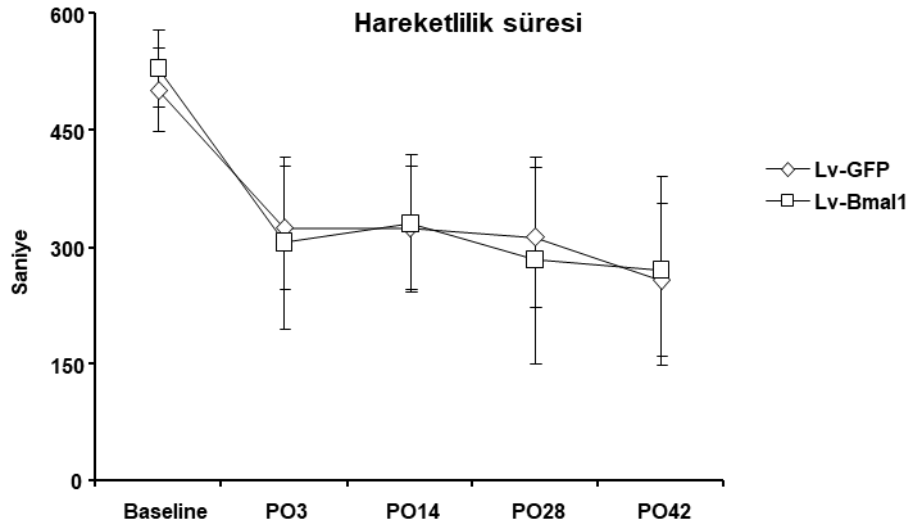
Şekil 4.8.2.5 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde ortalama hızları.

scRNA ve shBmal1 deney gruplarında beyin felcinin indüklenmesi ile beraber PO3 gününde her iki grupta da açık alan testi süresince ortalama hızlarının azaldığı gözlemlenmiştir. Açık alan testinin tekrarlandığı PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde scRNA ve shBmal1 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.5).



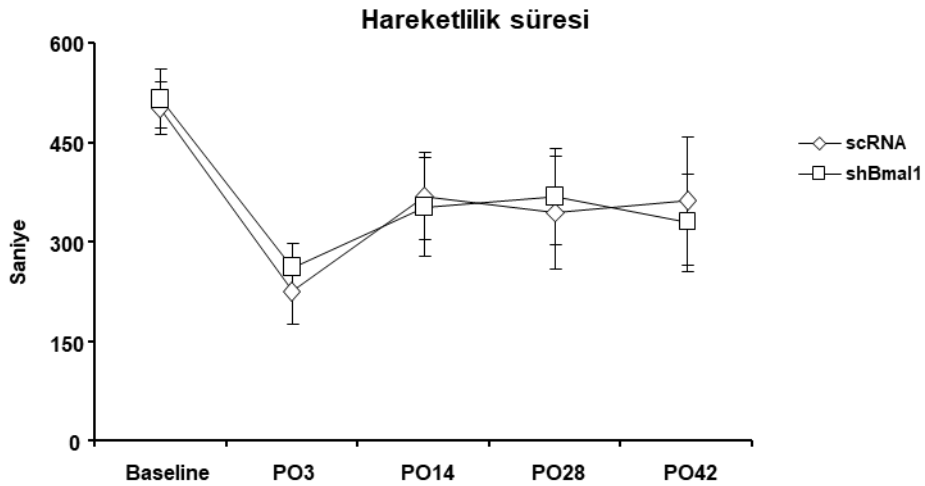
Şekil 4.8.2.6 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde ortalama hızları.

Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarında beyin felcinin indüklenmesi ile beraber PO3 gününde her iki grupta da ortalama hızlarının azaldığı görülmüştür. Açık alan testinin tekrarlandığı PO3 ve PO14 ve PO42. günlerde doğal tür grubunda bulunan farelerin ortalama hızlarının Bmal1 *knockout* grubuna kıyasla arttığı gözlemlenmiştir. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizler neticesinde PO3, PO14 ve PO42. günlerdeki bu artışın istatistiksel olarak bir anlamlılık taşımadı görülmüştür ($p>0.05$, (independent samples t test). PO28 gününde yapılan istatistiksel analizde ise bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.6).



Şekil 4.8.2.7 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde hareketli kaldıkları süre.

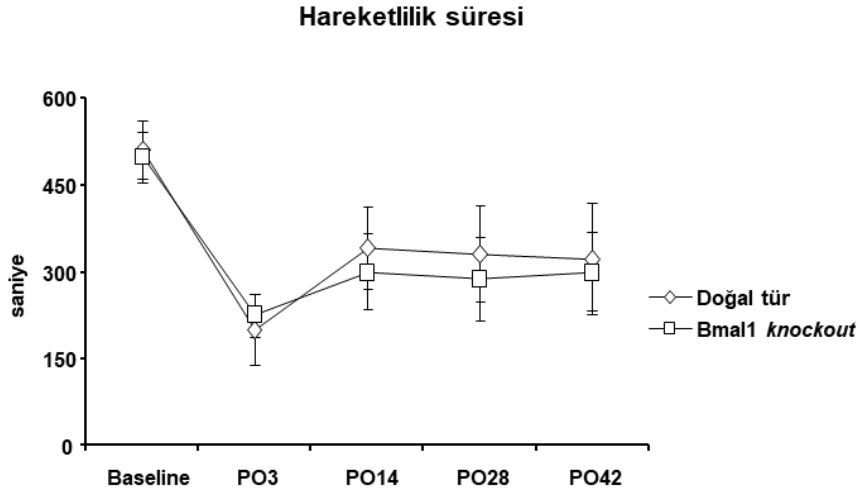
Beyin felci öncesinde normal fizyolojik koşullar altında alınan ölçümlerde Lv-GFP ve Lv-Bmal1 deney gruplarındaki farelerin ortalama hareketlilik süresi 500 sn olarak hesaplanmıştır. Beklendiği üzere beyin felci sonrasında hayvanların hareketlilik süreleri azalmıştır. PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde tekrarlanan açık alan testinin verilerine bakıldığında gruplar arasında hareketlilik süresi bakımından istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.7).



Şekil 4.8.2.8 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde hareketli kaldıkları süre.

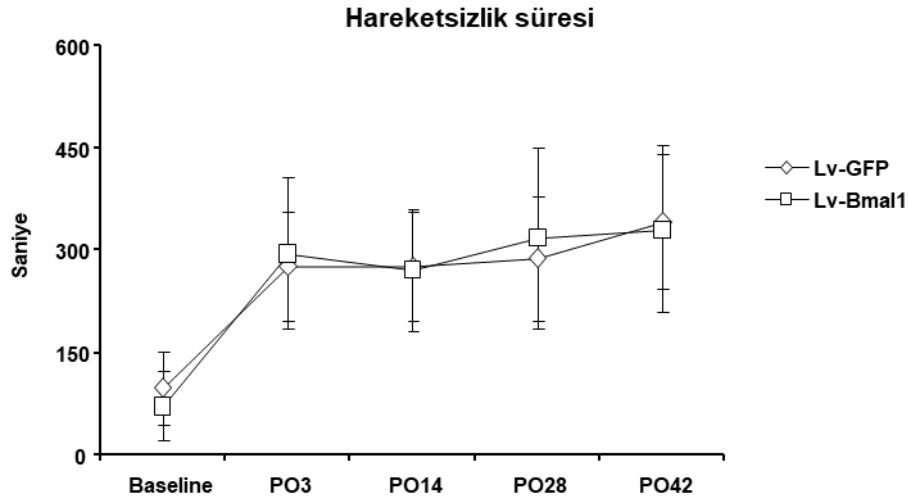
İskemi öncesinde normal fizyolojik koşullar altında alınan ölçümlerde Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarında olduğu gibi scRNA ve shBmal1 deney gruplarındaki farelerin de ortalama

hareketlilik süresi 500 sn olarak hesaplanmıştır. Beklendiği üzere beyin felci sonrasında hayvanların hareketlilik süreleri azalmıştır. PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde tekrarlanan açık alan testinin verilerine bakıldığında gruplar arasında hareketlilik süresi bakımından istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.8).



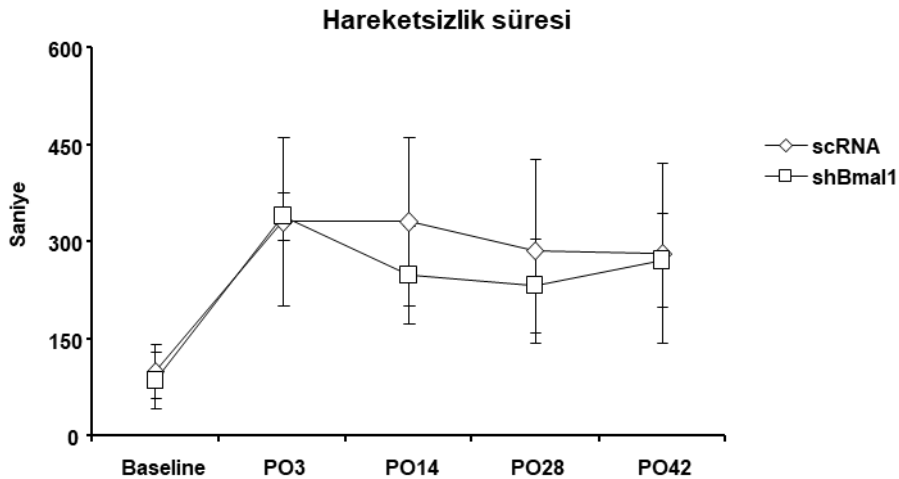
Şekil 4.8.2.9 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde hareketli kaldıkları süre.

Beyin felci öncesinde normal fizyolojik koşullar altında alınan ölçümlerde Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarındaki farelerin ortalama hareketlilik süresi 500 sn olarak hesaplanmıştır. Beklendiği üzere orta serebral arter tıkanması metodu sonrasında iki grup içerisindeki tüm hayvanların hareketlilik süreleri azalmıştır. PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde tekrarlanan açık alan testinin verilerine bakıldığında doğal tür içerisinde bulunan farelerin hareketlilik süresi Bmal1 *knockout* grubuna kıyasla biraz daha fazla olduğu görülmüştür. Fakat gruplar arasında hareketlilik süresi bakımından istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.9).



Şekil 4.8.2.10 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde hareketsiz kaldıkları süre.

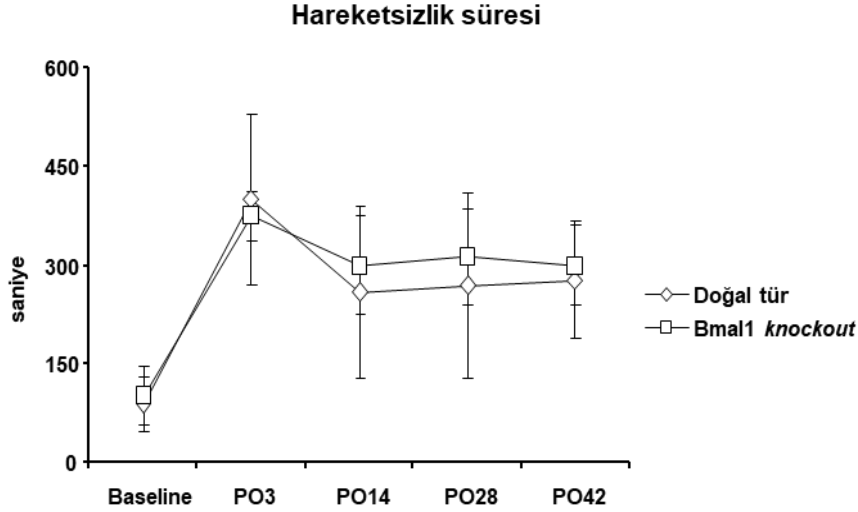
Lv-GFP ve Lv-Bmal1 deney gruplarının hareketlilik sürelerini 600 saniyeye tamamlayacak şekilde farelerin hareketsiz kaldıkları süreler hesaplanmıştır. Elde edilen verilere bakıldığında iskeminin indüklenmesi sonrasında PO3. günde farelerin hareketsiz kaldıkları süreler artmış olup deneyin tekrarlandığı PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde hareketsizlik süreleri bakımından istatistiksel olarak herhangi bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.10).



Şekil 4.8.2.11 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde hareketsiz kaldıkları süre.

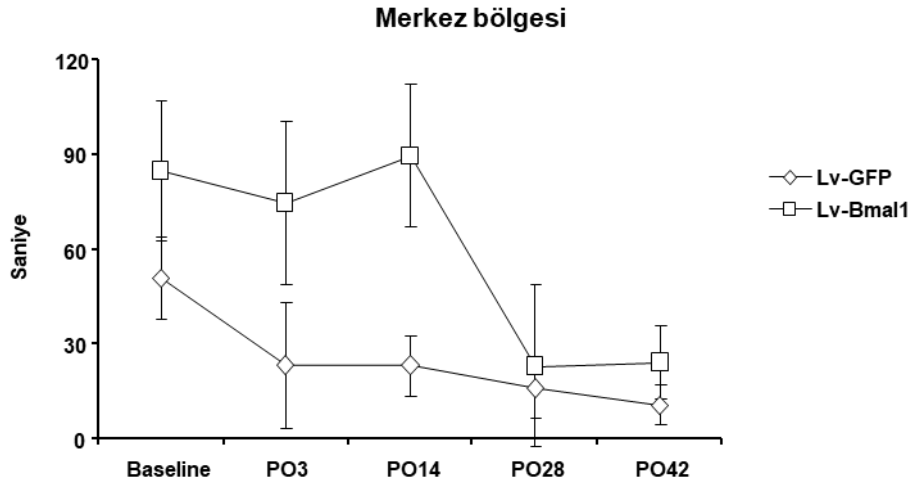
scRNA ve shBmal1 deney gruplarının hareketlilik sürelerini 600 saniyeye tamamlayacak şekilde farelerin hareketsiz kaldıkları süreler hesaplanmıştır. Elde edilen verilere bakıldığında iskeminin indüklenmesi sonrasında PO3. günde farelerin hareketsiz

kaldıkları sürelerin arttığı gözlemlenmiştir. Deneyin tekrarlandığı PO14 ve PO28. günlerde scRNA grubuna ait farelerin hareketsizlik süresinin shBmal1 grubuna kıyasla daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Fakat bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test). Ek olarak, PO42. günde farelerin hareketsiz kaldıkları sürelerin birbirine yaklaştığı görülmektedir (Şekil 4.8.2.11).



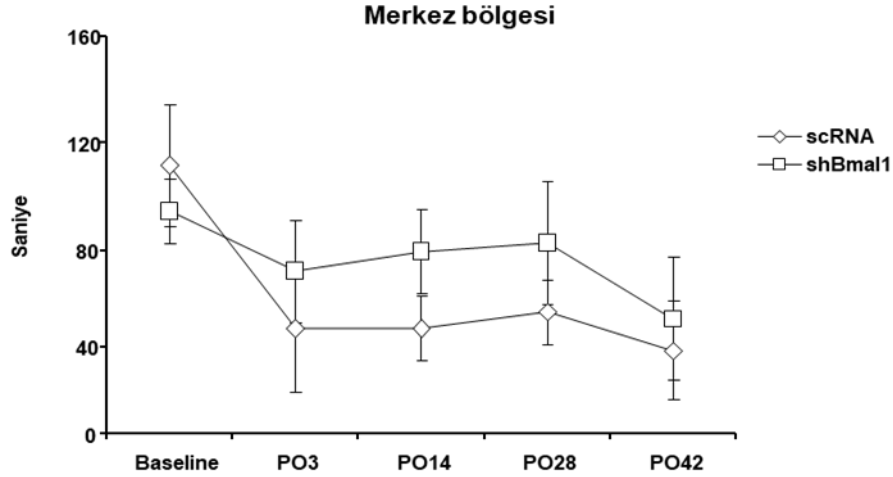
Şekil 4.8.2.12 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde hareketsiz kaldıkları süre.

Açık alan testinin toplam süresi 600 olacak şekilde testler gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle hareketlilik süresini 600 saniyeye tamamlayacak şekilde hareketsizlik süresi hesaplanmıştır. Elde edilen veriler beyin felci sonrasında PO3 gününde hayvanların hareketsizlik süresinin maksimuma ulaştığı ve PO14, PO28 ve PO42. günlerde bu hareketsizlik süresinin azaldığı görülmüştür. Gruplar arasında PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde hareketsizlik süreleri bakımından istatistiksel olarak herhangi bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.12).



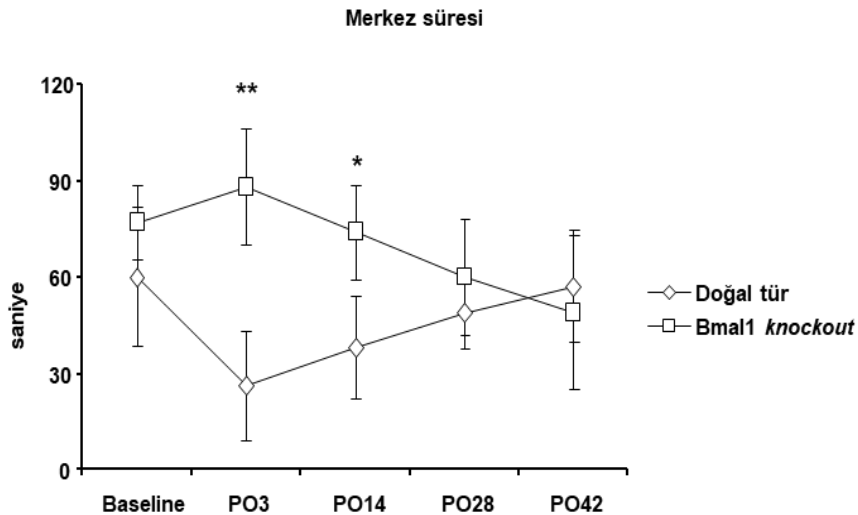
Şekil 4.8.2.13 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde merkez bölgesinde geçirdikleri süre.

Anymaze programı vasıtasıyla açık alan testinde kullanılan silindir sanal olarak 3 farklı alana ayrılmış olup bu sanal alanların orta kısmı olan ve merkez alan olarak isimlendirilen alanda Lv-GFP ve Lv-Bmal1 grubundaki farelerin geçirdikleri süreler hesaplanmıştır. Beyin felci öncesinde alınan ölçümlerde Lv-Bmal1 deney grubundaki farelerin merkez alanda geçirdikleri sürenin Lv-GFP grubuna kıyasla daha fazla olduğu fakat bu sürenin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$, (independent samples t test)). PO3 ve PO14. günde tekrarlanan deneylerde Lv-Bmal1 deney grubundaki farelerin merkez alanda geçirdikleri süre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, (independent samples t test)) bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. PO28 ve PO42. günlerde alınan ölçümlerde Lv-Bmal1 grubundaki farelerin Lv-GFP grubuna göre merkez alanda geçirdikleri sürenin daha fazla olduğu fakat bu farklılığın istatistiksel olarak bir anlamlılık ifade etmediği gösterilmiştir ($p > 0.05$, (independent samples t test)) (Şekil 4.8.2.13).



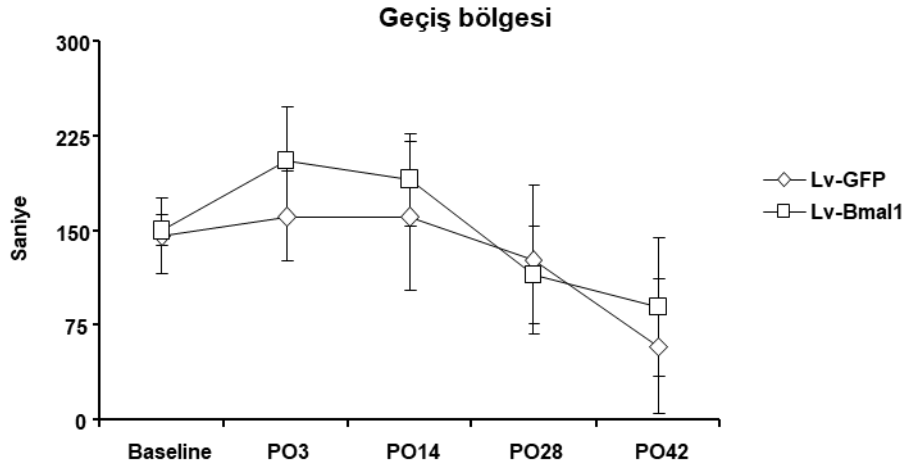
Şekil 4.8.2.14 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde merkez bölgesinde geçirdikleri süre.

Anymaze programı vasıtasıyla açık alan testinde kullanılan silindir sanal olarak 3 farklı alana ayrılmış olup bu sanal alanların orta kısmı olan ve merkez alan olarak isimlendirilen alanda scRNA ve shBmal1 grubundaki farelerin geçirdikleri süreler hesaplanmıştır. shBmal1 deney grubundaki farelerin merkez alanda geçirdiği süreler operasyon öncesinde Lv-GFP grubu ile aynı olduğu fakat iskeminin indüklenmesinden sonra PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde scRNA grubuna göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Fakat bu artışın istatistiksel olarak bir anlamlılık ifade etmediği gösterilmiştir ($p > 0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.14).



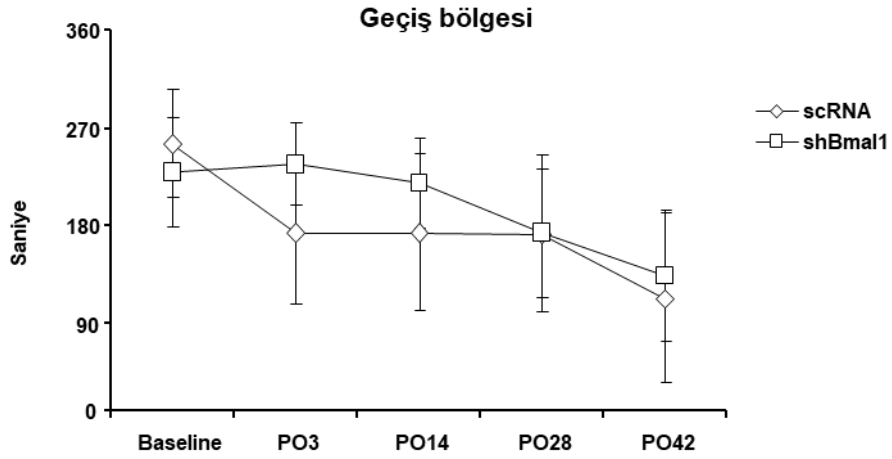
Şekil 4.8.2.15 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde merkez bölgesinde geçirdikleri süre.

Anymaze programı vasıtasıyla açık alan testinde kullanılan silindir sanal olarak 3 farklı alana ayrılmış olup bu sanal alanların orta kısmı olan ve merkez alan olarak isimlendirilen alanda Doğal tür ve Bmal1 *knockout* grubundaki farelerin geçirdikleri süreler hesaplanmıştır. Beyin felci operasyonlarından önce normal fizyolojik koşullar altında yapılan ölçümlerde Bmal1 *knockout* grubundaki farelerin daha fazla merkez alanda süre geçirdikleri tespit edilmiştir. Fakat bu süre farkının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Beyin felci sonrasında PO3 ve PO14 günlerinde tekrarlanan testlerde Bmal1 *knockout* grubuna ait olan farelerin Doğal tür grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde merkez alanda daha fazla süre geçirdiği görülmüştür ($p < 0.05$, (independent samples t test). PO28 ve PO42 günlerinde tekrarlanan deneylerde istatistiksel olarak herhangi bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.15).



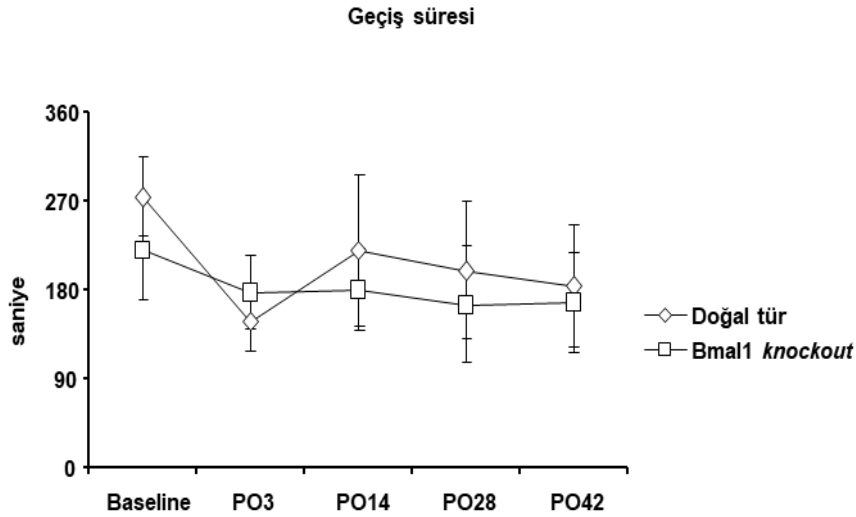
Şekil 4.8.2.16 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde geçiş bölgesinde geçirdikleri süre.

Farelerin geçiş bölgesinde geçirdiği süreler hesaplandığında Lv-GFP ve Lv-Bmal1 deney gruplarındaki farelerin operasyon öncesinde geçiş alanında geçirdiği sürelerin aynı seviyede olduğu ve iskemiden sonra PO3. günde geçiş bölgesinde geçirdikleri sürelerin arttığı ve sonrasında PO14, PO28 ve PO42. günlerde giderek azaldığı gösterilmiştir. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizlerde istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılığın olmadığı gösterilmiştir ($p > 0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.16).



Şekil 4.8.2.17 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde geçiş bölgesinde geçirdikleri süre.

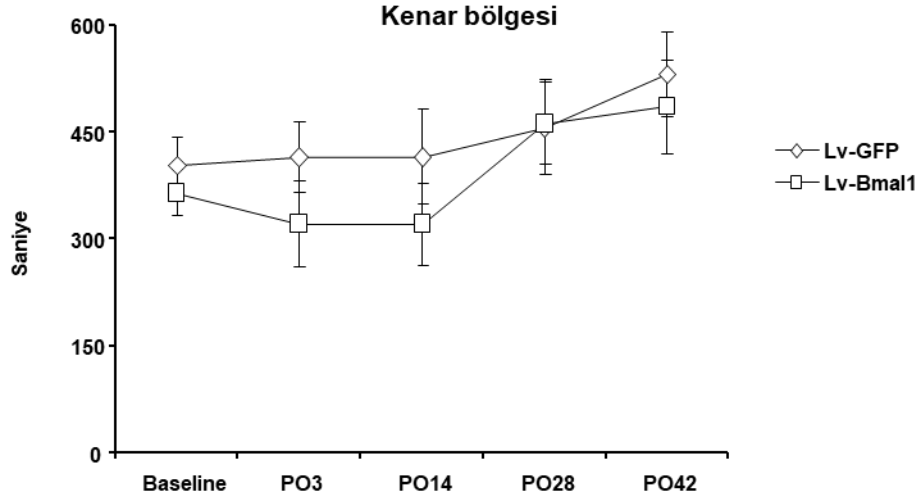
Farelerin geçiş bölgesinde geçirdiği süreler hesaplandığında scRNA ve shBmal1 deney gruplarındaki farelerin operasyon öncesinde geçiş alanında geçirdiği sürelerin aynı seviyede olduğu gösterilmiştir. Deneyin tekrarlandığı PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde gruplar arasında yapılan istatistiksel analizlerde istatistiksel olarak herhangi bir değişimin olmadığı gösterilmiştir ($p > 0.05$, (independent samples t test)). (Şekil 4.8.2.17).



Şekil 4.8.2.18 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde geçiş bölgesinde geçirdikleri süre.

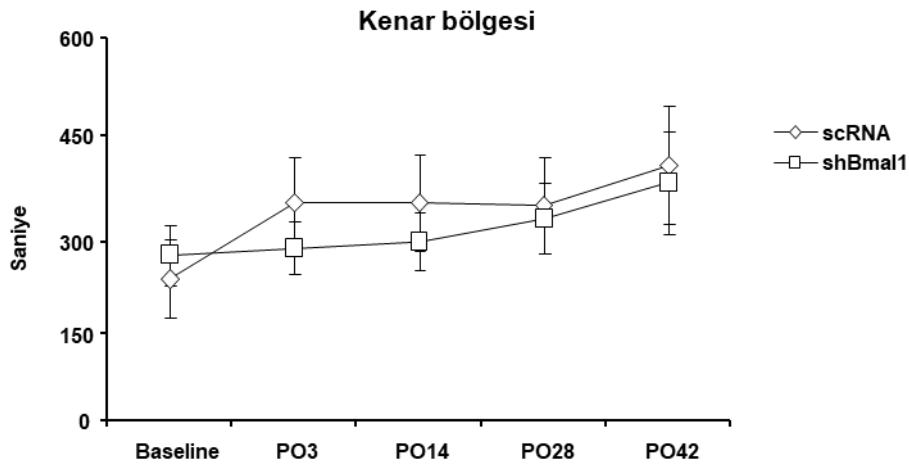
Anymaze programı vasıtasıyla açık alan testinde kullanılan silindir sanal olarak 3 farklı alana ayrılmış olup merkez ve kenar bölge arasında kalan ve geçiş bölgesi alan olarak isimlendirilen alanda Doğal tür grubundaki farelerin fizyolojik koşullar altında geçiş bölgesindeki geçirmiş olduğu sürenin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Doğal tür ve Bmal1 *knockout* grupları arasında operasyon öncesi, PO3, PO14, PO28 ve PO42 günlerde yapılan

deneylerden elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildiğinde gruplar arasında herhangi bir istatistiksel değişimin olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.18).



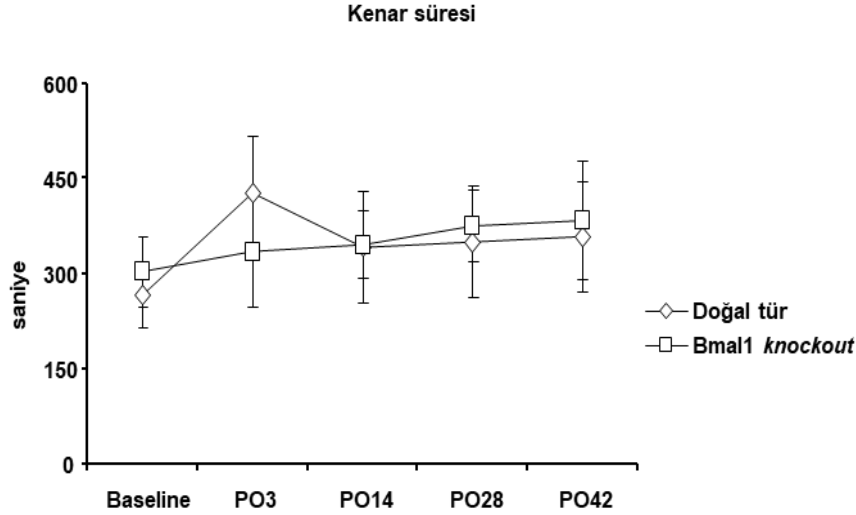
Şekil 4.8.2.19 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde kenar bölgesinde geçirdikleri süre.

Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarındaki farelerin açık alan testinde kullanılan silindirin kenar bölgesinde geçirdikleri süreler iskemiden önce normal fizyolojik koşullarda ve iskeminin indüklenmesinden sonra PO3, PO14, PO28, PO42. günlerde Anymaze programı vasıtasıyla incelenmiştir. Elde edilen veriler Lv-GFP ve Lv-Bmal1 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişimin olmadığını göstermektedir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.19).



Şekil 4.8.2.20 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde kenar bölgesinde geçirdikleri süre.

scRNA ve shBmal1 gruplarındaki farelerin açık alan testinde kullanılan silindirin kenar bölgesinde geçirdikleri süreler iskemiden önce normal fizyolojik koşullarda ve iskeminin indüklenmesinden sonra PO3, PO14, PO28, PO42. günlerde Anymaze programı vasıtasıyla incelenmiştir. Elde edilen veriler scRNA ve shBmal1 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişimin olmadığını göstermektedir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.20).

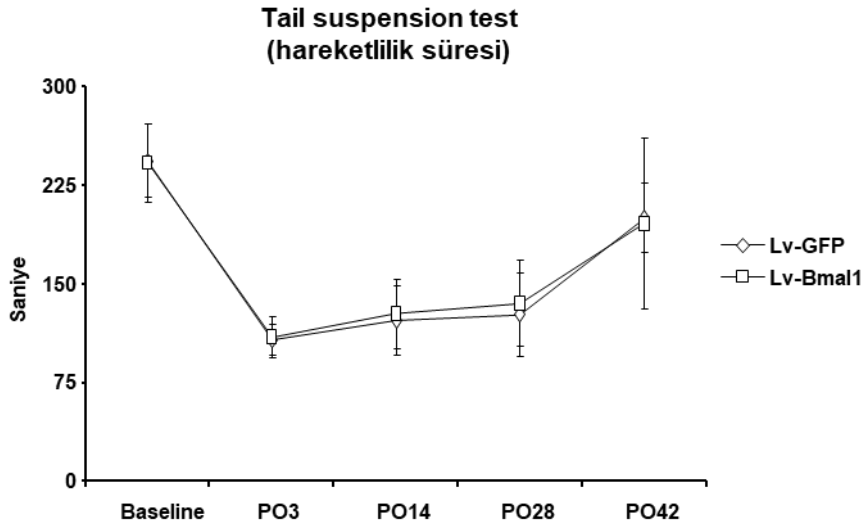


Şekil 4.8.2.21 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) açık alan testinde kenar bölgesinde geçirdikleri süre.

Anymaze programı vasıtasıyla açık alan testinde kullanılan silindir sanal olarak 3 farklı alana ayrılmış olup bu sanal alanların en dış kısmı olan ve kenar alan olarak isimlendirilen alanda Doğal tür ve Bmal1 *knockout* farelerin geçirdikleri süreler hesaplanmıştır. Operasyon öncesi, PO3, PO14, PO28 ve PO42 günlerde yapılan deneylerden elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildiğinde gruplar arasında herhangi bir istatistiksel değişimin olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.2.21).

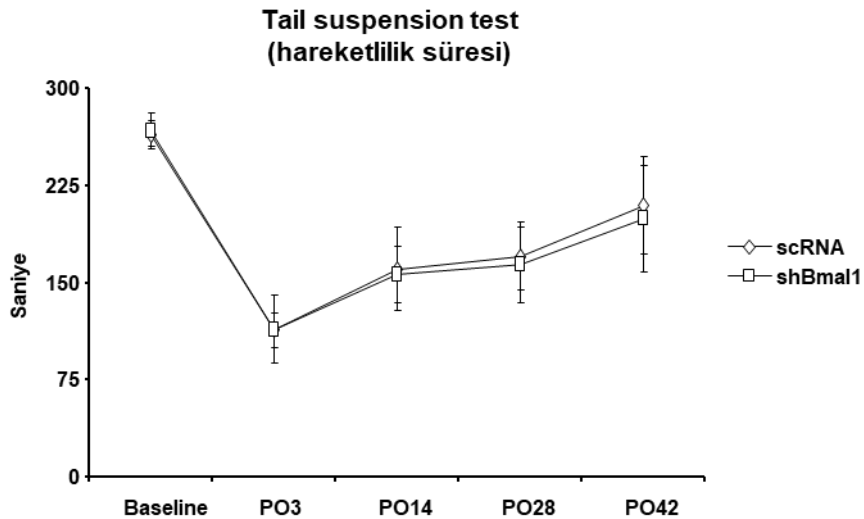
4.8.3 Kuyruktan asma testi

Tüm gruplar için beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) kuyruktan asma testi uygulanmıştır. Test süresince farelerin hareketli ve hareketsiz kaldıkları süreler belirlenmiştir.



Şekil 4.8.3.1 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) kuyruktan asma testinde hareketli oldukları sürenin analizi.

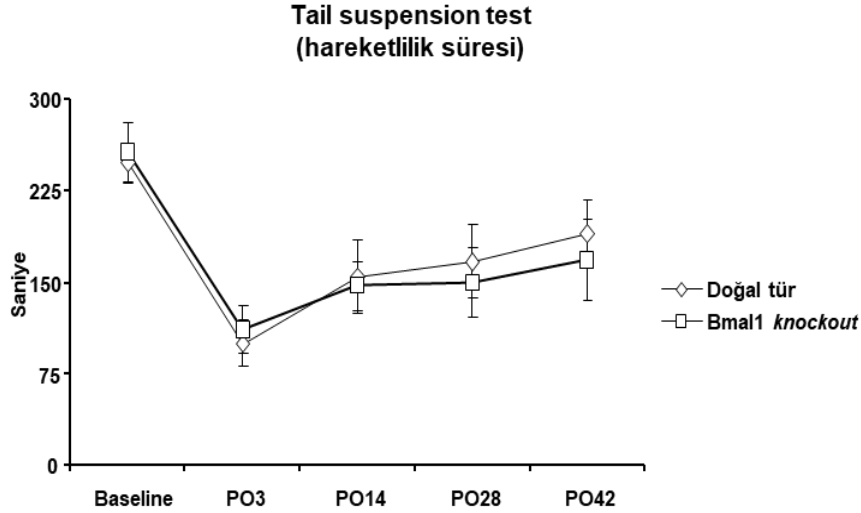
Normal fizyolojik koşullar altında Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarındaki farelerin ortalama hareketli kalma süreleri birbirine yakın değerler çıkmıştır. Beyin felci sonrasında PO3’de tekrarlanan kuyruktan asma testine bağlı olarak farelerin hareketli kalma sürelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Testin tekrarlandığı PO14, PO28 ve PO42. günlerde Lv-GFP ve Lv-Bmal1 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.3.1).



Şekil 4.8.3.2 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) kuyruktan asma testinde hareketli oldukları sürenin analizi.

Normal fizyolojik koşullar altında scRNA ve shBmal1 gruplarındaki farelerin ortalama hareketli kalma süreleri birbirine yakın değerler çıkmıştır. Beyin felci sonrasında PO3’de

tekrarlanan kuyruktan asma testine bağılı olarak farelerin hareketli kalma sürelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Testin tekrarlandığı PO14, PO28 ve PO42. günlerde Lv-GFP ve Lv-Bmal1 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.3.2).

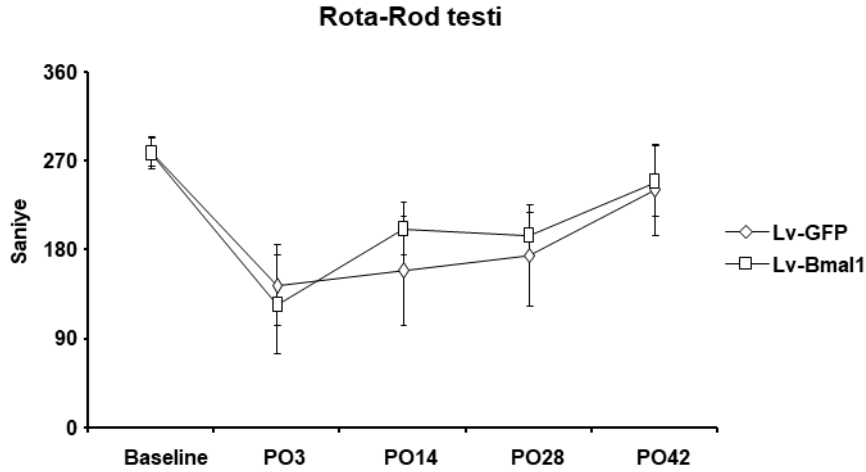


Şekil 4.8.3.3 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) kuyruktan asma testinde hareketli oldukları sürenin analizi.

Beyin felci öncesinde fizyolojik koşullar altında alınan ölçümlerde doğal tür ve Bmal1 *knockout* farelerin kuyruktan asma testine vermiş oldukları tepkinin benzer olduğunu gözlemledik. Beyin felcinin indüklenmesinden sonra PO3 gününde yapılan analizlerde farelerin hareketli kaldıkları sürelerin azaldığı buna bağılı olarak hareketsiz kaldıkları sürenin arttığı gözlemlenmiştir. Özellikle PO28 ve PO42 günlerinde tekrarlanan kuyruktan asma testinde Doğal tür farelerinin hareketlilik süresinin Bmal1 *knockout* guruba kıyasla artmaya başladığı gözlemlenmiştir. Fakat gruplar arasında yapılan istatistiksel analizlerde bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.3.3).

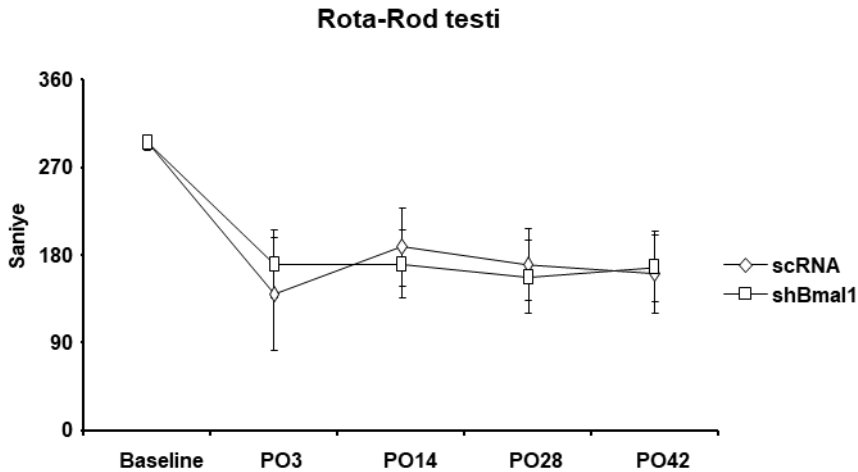
4.8.4 Rota-Rod testi

Tüm gruplar için beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) Rota-Rod testi uygulanarak farelerin motor koordinasyonları ölçülmüştür. Bu amaçla belirtilen günlerde her bir fare 30 dakika aralıklarla toplam 5 kere (her bir deney günü için) bu teste tabi tutulmuştur. Beş tekrarın ortalaması alınarak ilgili günün davranış verisi olarak analize katılmıştır.



Şekil 4.8.4.1 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan Rota-Rod testi ile motor koordinasyon analizi.

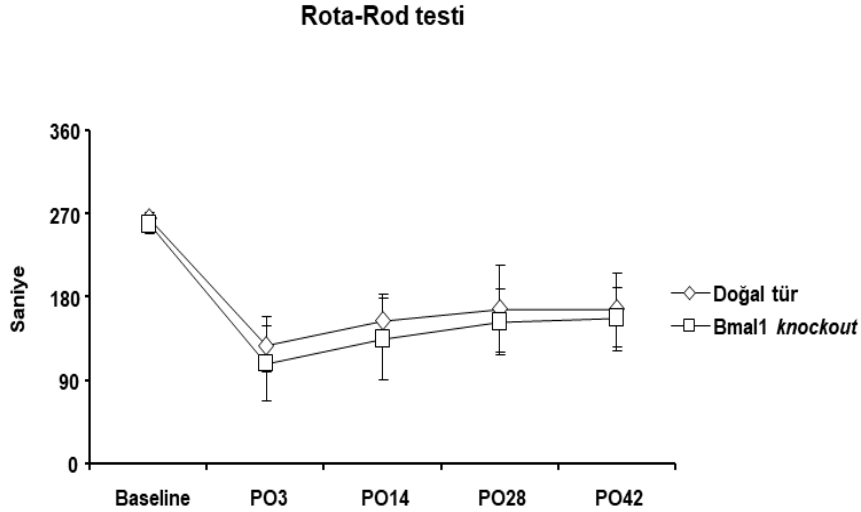
Motor koordinasyonun belirlenmesi için önemli bir test olan Rota-Rod testinin sonucuna bakıldığında normal fizyolojik koşullar altında ortalama 280 saniye süresince farelerin Rota-Rod platformunda kaldığı gözlemlenmektedir. İskemi sonrasında PO3. günde beklediği üzere farelerin motor koordinasyonlarında düşüş görülmektedir. Deneyin tekrarlandığı PO14, PO28 ve PO42. günlerde Lv-Bmal1 deney grubundaki farelerin motor koordinasyonları daha iyi olduğu gözlemlenmiş olup deney grupları arasındaki bu farklılığın istatistiksel olarak bir anlamlılık ifade etmediği görülmüştür ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.4.1).



Şekil 4.8.4.2 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan Rota-Rod testi ile motor koordinasyon analizi.

scRNA ve shBmal1 deney grupları da Lv-GFP ve Lv-Bmal1 deney gruplarına benzer şekilde iskemi öncesinde yaklaşık olarak 280 saniye süresince Rota-Rod platformu üzerinde kaldıkları ve iskemi sonrasında motor koordinasyonları bozulduğu için platform üzerinde kalma

sürelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Deneyin tekrarlandığı PO14, PO28 ve PO42. günlerde shBmal1 deney grubundaki farelerin platform üzerinde kalma süreleri scRNA grubuna kıyasla daha az olduğu görülmüştür. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizler neticesinde gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık olduğu gösterilmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.4.2).

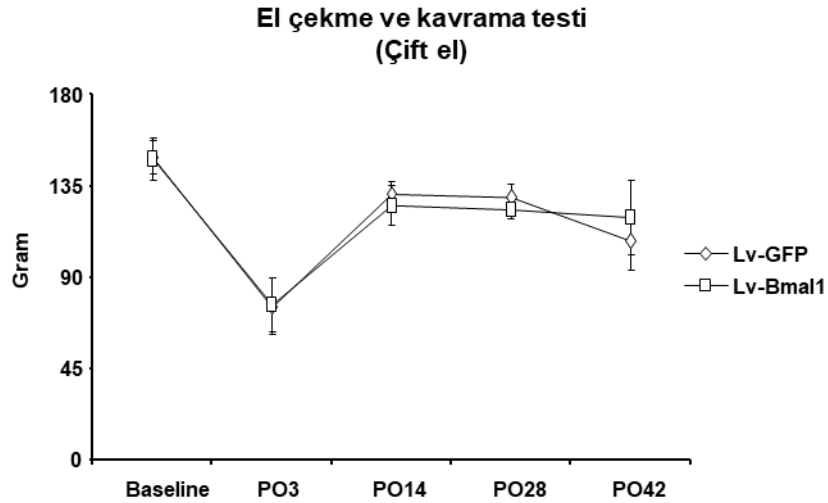


Şekil 4.8.4.3 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan Rota-Rod testi ile motor koordinasyon analizi.

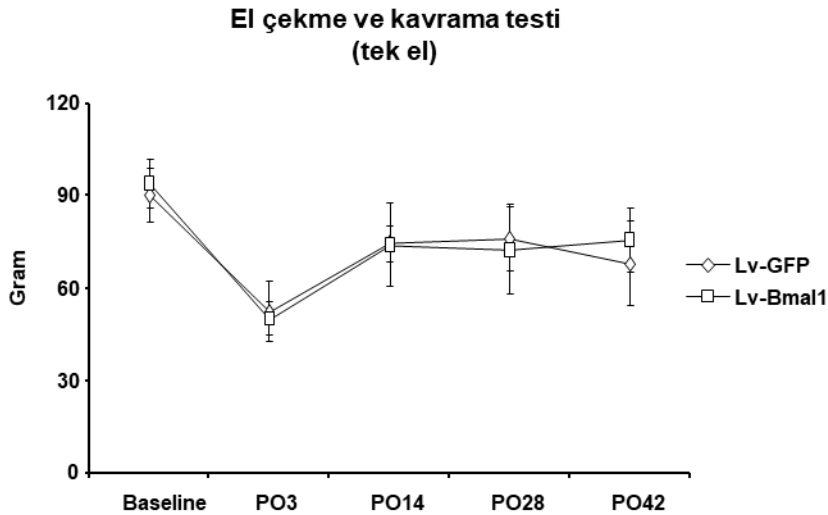
Motor koordinasyonun belirlenmesi için önemli bir test olan Rota-Rod testinin sonucuna bakıldığında normal fizyolojik koşullar altında ortalama 260 saniye süresince farelerin Rota-Rod platformunda kaldığı gözlemlenmektedir. Beyin felci sonrasında PO3. günde beklendiği üzere farelerin motor koordinasyonlarında düşüş görülmektedir. Deneyin tekrarlandığı PO14, PO28 ve PO42. günlerde Doğal tür deney grubundaki farelerin motor koordinasyonlarının Bmal1 *knockout* grubuna kıyasla biraz daha iyi olduğu fakat bu farklılığın istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık taşımadığı gösterilmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.4.3).

4.8.5 El çekme ve kavrama gücü testi

Fonksiyonel geri kazanımın belirlenmesi için grip strength testi kullanılmıştır. Bu test yardımıyla hem ön iki elin hem de beyin felci sonrası etkilenen elin kavrama gücünü ölçmek için kullanılmaktadır. Kavrama gücünü ölçmek için özel olarak tasarladığımız ve ucunda üçgen bir tel bulunan Newton metre (Medio-Line Spring Scale, metric, 300 g, Pesola AG, İsviçre) kullanılmıştır. Bu amaçla tüm gruplar için beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) farelerin hem tek el hem de çift çekme ve kavrama güçleri ölçülmüştür.

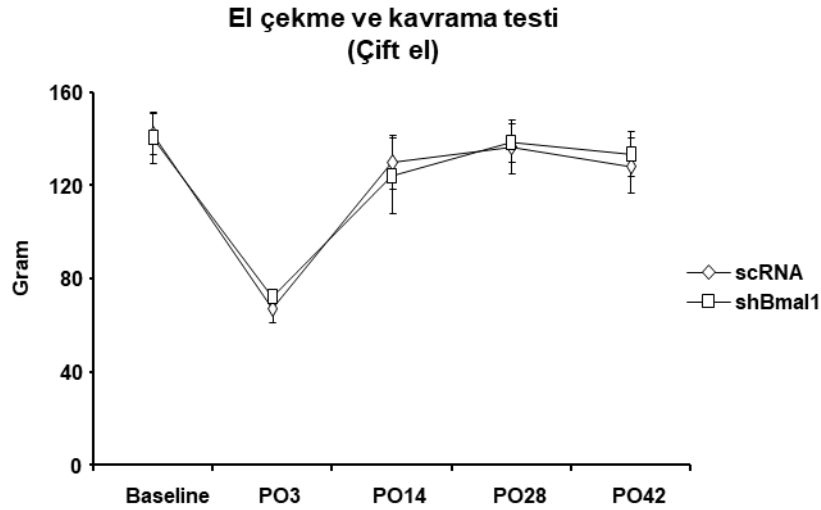


Şekil 4.8.5.1 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan grip strength testi ile çift el çekme ve kavrama gücünün belirlenmesi.

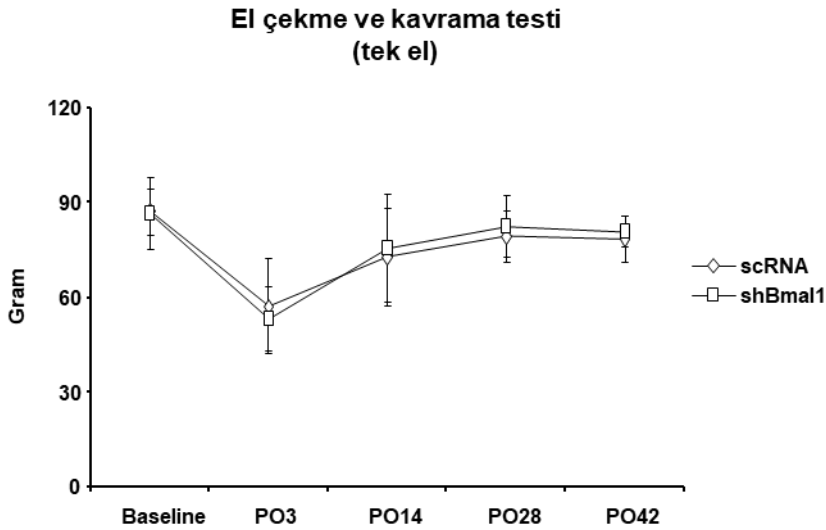


Şekil 4.8.5.2 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan grip strength testi ile tek el çekme ve kavrama gücünün belirlenmesi.

Lv-GFP ve Lv-Bmal1 deney gruplarından alınan normal fizyolojik koşullar altındaki değerlerin iskeminin indüklenmesi ile beraber azaldığı hem çift el hem de tek el ile yapılan grip strength testinde gösterilmiştir. Testin tekrarlandığı PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$, (independent samples t test). Fakat özellikle 42. Günde Lv-Bmal1 grubundaki farelerin çekme ve kavrama gücü hem tek el hem de çift el bazında biraz daha iyi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8.5.1 ve 4.8.5.2).

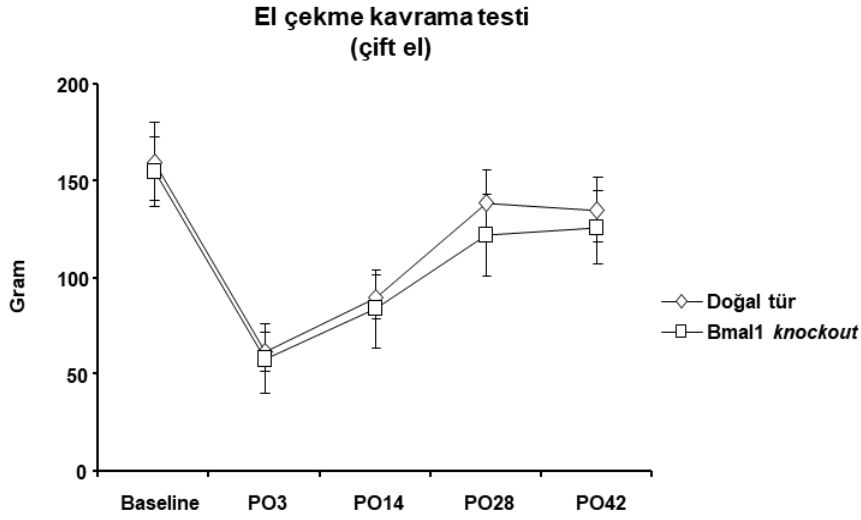


Şekil 4.8.5.3 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan grip strength testi ile çift el çekme ve kavrama gücünün belirlenmesi.

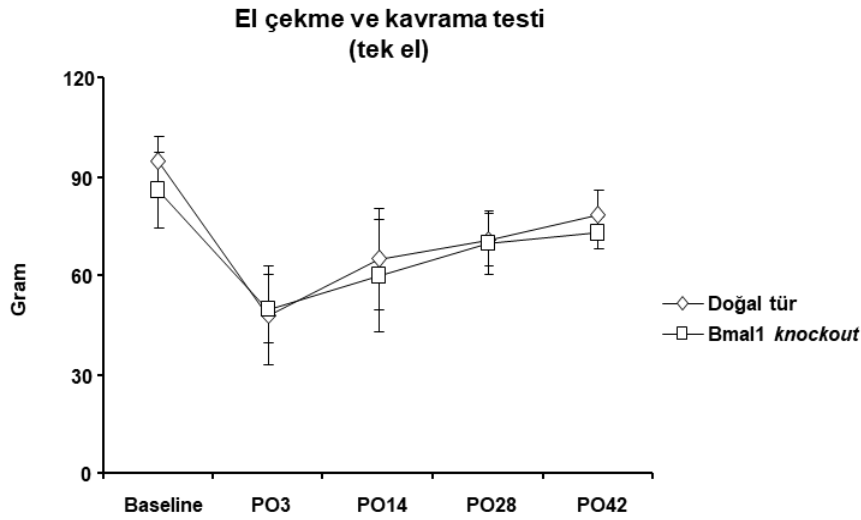


Şekil 4.8.5.4 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan grip strength testi ile tek el çekme ve kavrama gücünün belirlenmesi.

scRNA ve shBmal1 deney gruplarından alınan normal fizyolojik koşullar altındaki değerlerin iskeminin indüklenmesi ile beraber azaldığı hem çift el hem de tek el ile yapılan grip strength testinde gösterilmiştir. Testin tekrarlandığı PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.5.3 ve 4.8.5.4).



Şekil 4.8.5.5 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan grip strength testi ile çift el çekme ve kavrama gücünün belirlenmesi.

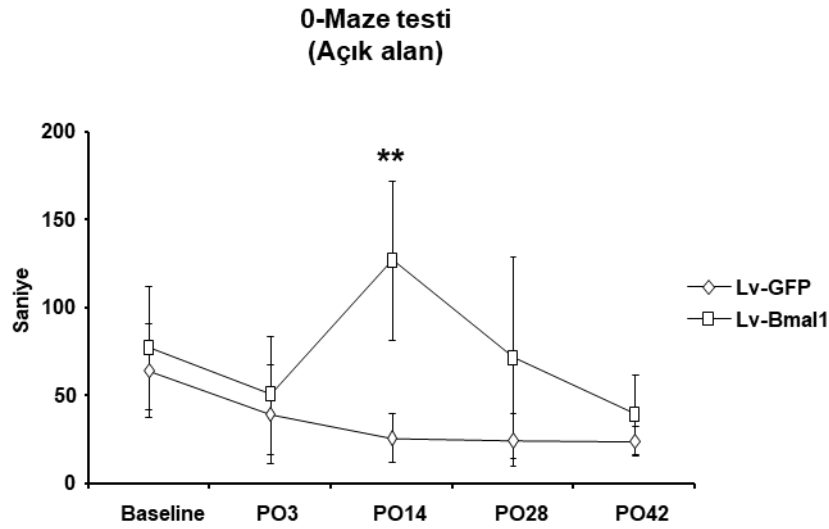


Şekil 4.8.5.6 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan grip strength testi ile tek el çekme ve kavrama gücünün belirlenmesi.

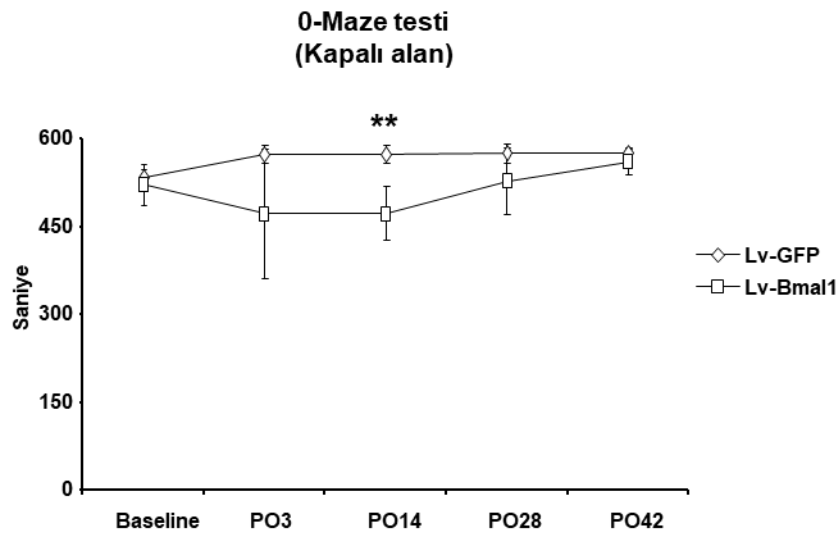
Doğal tür ve Bmal1 *knockout* deney gruplarından alınan fizyolojik koşullar altındaki değerlerin iskeminin indüklenmesi ile beraber azaldığı hem çift el hem de tek el ile yapılan grip strength testinde gösterilmiştir. Testin tekrarlandığı PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir ($p>0.05$, (independent samples t test). Çift el ile yapılan grip strength testinde doğal tür grubundaki farelerin Bmal1 *knockout* grubundaki farelere kıyasla daha iyi performans gösterdiği görülmesine rağmen istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır (Şekil 4.8.5.5 ve 4.8.5.6).

4.8.6 Yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-maze)

Yerden 50 cm yükseklikte, 50 cm çapında ve 5,5 cm genişliğinde olan yuvarlak platformun 90° karşılıklı olacak şekilde 15 cm yükseklikte iç ve dış duvarlarla birlikte kapalı alan denilen bölümü oluşturulmuştur. Kalan bölümler ise açık bölge olarak isimlendirilmiştir. Fareler platform üzerinde kapalı olana konularak 10 dk süresince kamera ve Anymaze bilgisayar programı vasıtasıyla gözlemlenmiştir. Bu amaçla tüm gruplar için beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) farelerin yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-Maze) üzerinde açık ve kapalı alan içerisinde geçirdikleri süreler hesaplanmıştır.

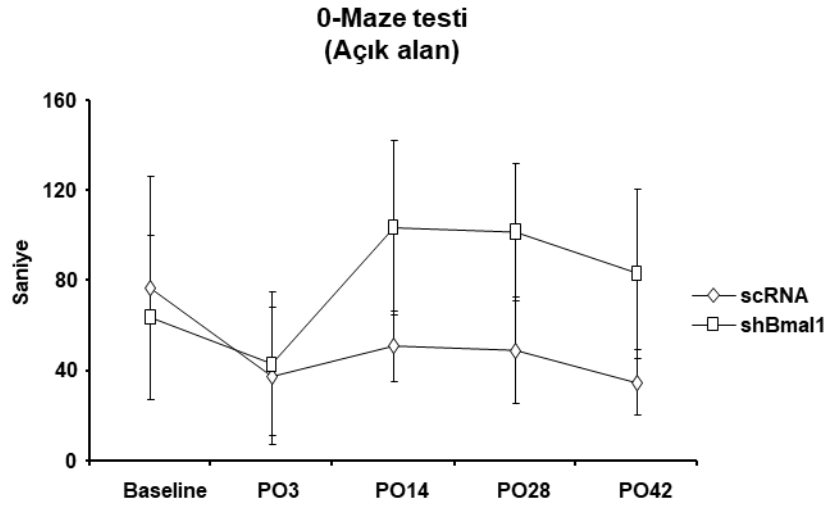


Şekil 4.8.6.1 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-Maze) platformunda açık alanda geçirdiği sürenin analizi.

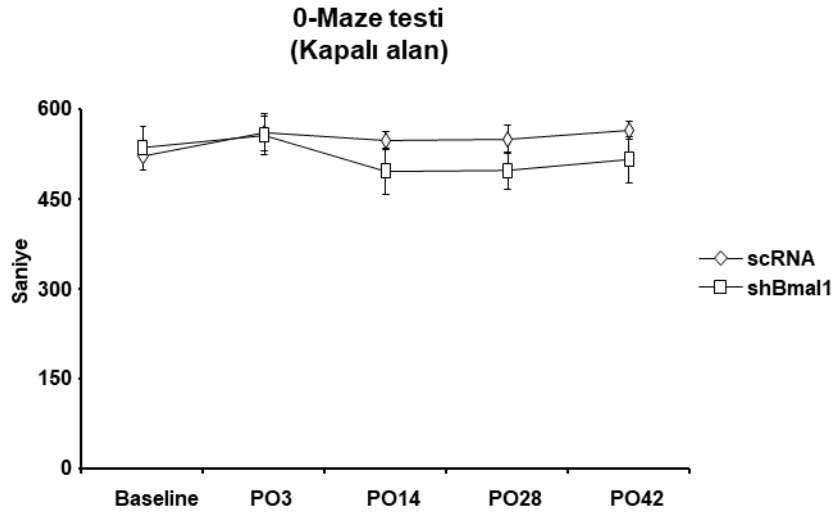


Şekil 4.8.6.2 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-Maze) platformunda kapalı alanda geçirdiği sürenin analizi.

Lv-GFP ve Lv-Bmal1 deney gruplarının normal fizyolojik koşullar altında yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-Maze) açık alan ve buna bağlı olarak da kapalı alanda geçirdikleri süreler birbirlerine yakın değerlerde bulunmuş olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test)). Lv-Bmal1 grubundaki farelerin PO14. günde Lv-GFP grubuna kıyasla açık alanda geçirdikleri sürenin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$, (independent samples t test)) bir şekilde daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca PO28 ve PO42. günlerde tekrarlanan testlerde Lv-Bmal1 deney grubundaki farelerin Lv-GFP grubuna göre daha fazla olduğu fakat bu zaman noktalarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test)) (Şekil 4.8.6.1 ve 4.8.6.2).

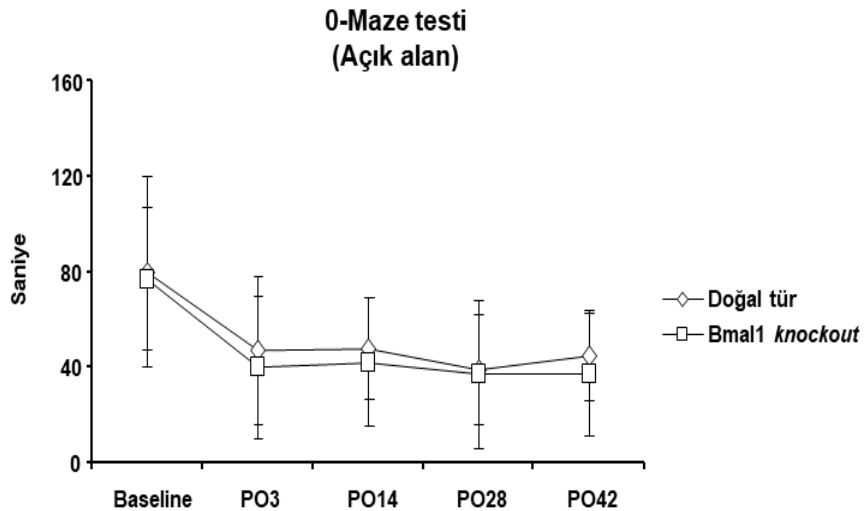


Şekil 4.8.6.3 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-Maze) platformunda açık alanda geçirdiği sürenin analizi.

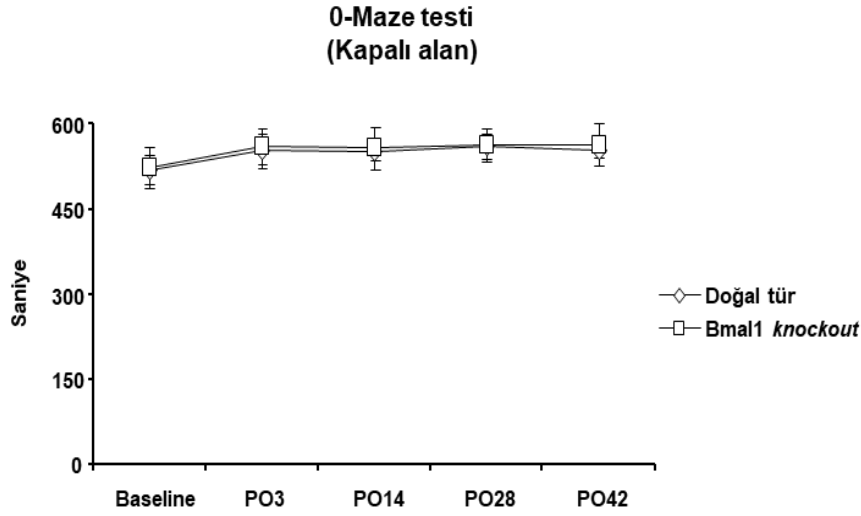


Şekil 4.8.6.4 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-Maze) platformunda açık alanda geçirdiği sürenin analizi.

scRNA ve shBmal1 deney grupların normal fizyolojik koşullar altında yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-Maze) açık alan ve buna bağlı olarak da kapalı alanda geçirdikleri süreler birbirlerine yakın değerlerde bulunmuş olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test)). Testin tekrarlandığı PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde shBmal1 grubundaki farelerin açık alanda daha fazla kaldığı fakat bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterilmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.6.3 ve 4.8.6.4).



Şekil 4.8.6.5 Doğal tür ve Bmal1 knockout gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-Maze) platformunda açık alanda geçirdiği sürenin analizi.

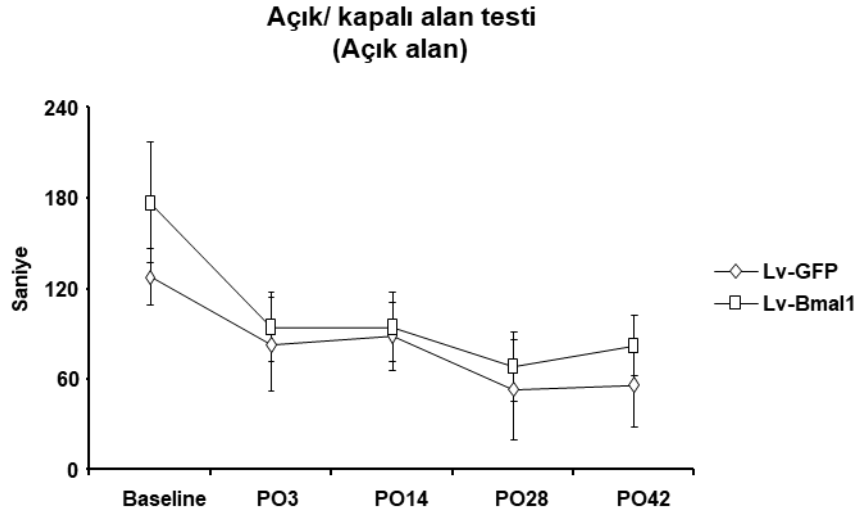


Şekil 4.8.6.6 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan yükseltilmiş 0-labirenti (Elevated 0-Maze) platformunda kapalı alanda geçirdiği sürenin analizi.

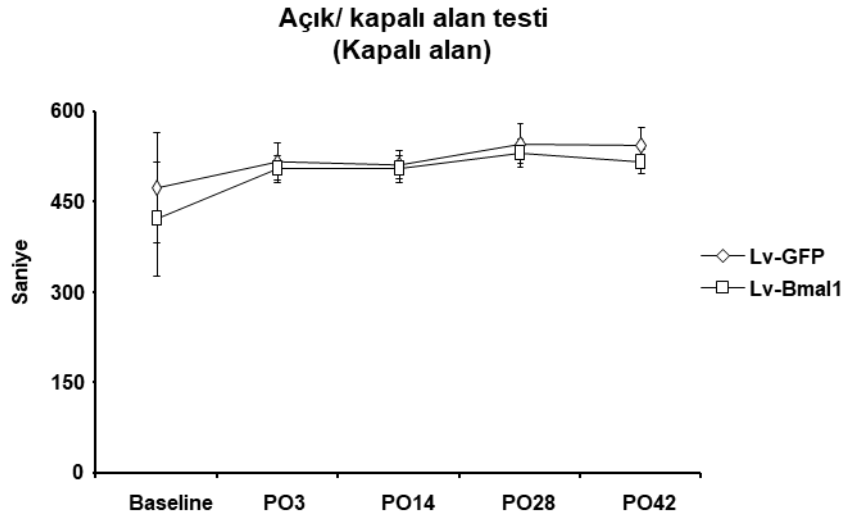
0-maze testi aracılığıyla beyin felci operasyonlarından önce yapılan baseline ve beyin felci sonrasında PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde Doğal tür ve Bmal1 *knockout* fareleri arasında istatistiksel olarak bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.6.5 ve 4.8.6.6).

4.8.7 Açık/kapalı alan testi

Açık kapalı alan testi anksiyetenin belirlenmesinde kullanılan önemli bir testtir. 20 cm x 40 cm ölçülerinde yarısının üzeri kapalı olan bir kutudan oluşan testte açık ve kapalı alanlar arasında farelerin giriş çıkış yapabilecekleri bir açıklık bulunmaktadır. Fareler aydınlık alana bırakıldıktan sonra 10 dk süresince açık/kapalı alan testine tabi tutulmuştur. Bu amaçla tüm gruplar için beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) farelerin açık/ kapalı alan testinde açık ve kapalı alan içerisinde geçirdikleri süreler hesaplanmıştır.

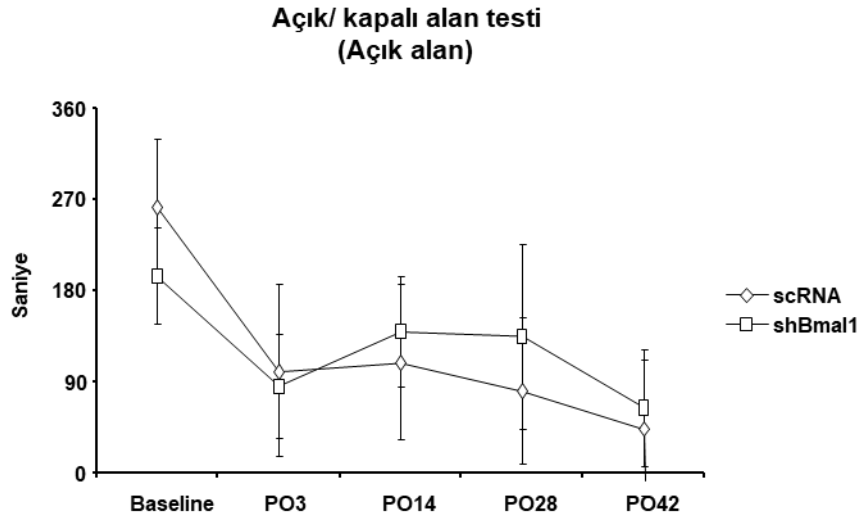


Şekil 4.8.7.1 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan açık/ kapalı alan platformunda açık alanda geçirdiği sürenin analizi.

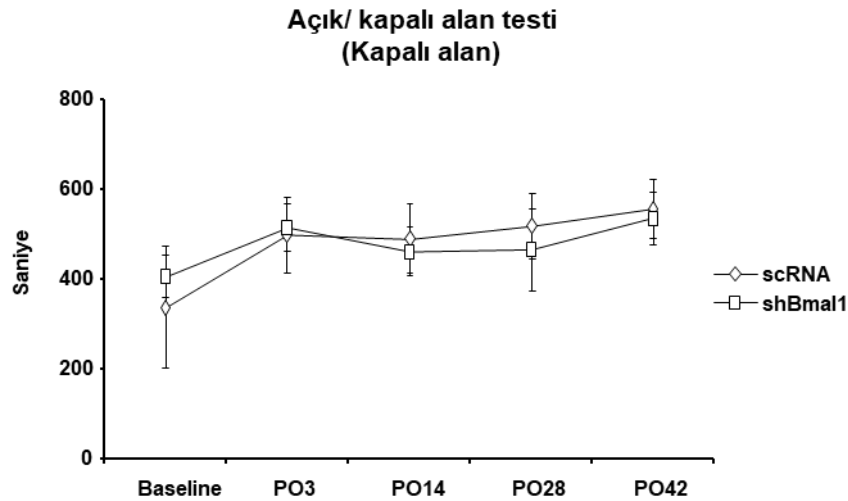


Şekil 4.8.7.2 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan açık/ kapalı alan platformunda kapalı alanda geçirdiği sürenin analizi.

Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarındaki farelerin normal fizyolojik koşullar altında açık alanda geçirdikleri süreler iskeminin indüklenmesi ile beraber azaldığı ve testin tekrarlandığı PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde Lv-Bmal1 grubundaki farelerin aydınlık alanda geçirdikleri süreler Lv-GFP grubuna göre kıyasla daha fazla olduğu gözlemlenmesine rağmen gruplar arasında yapılan istatistiksel analizler neticesinde gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılığın olmadığı gözlemlenmiştir ($p > 0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.7.1 ve 4.8.7.2).

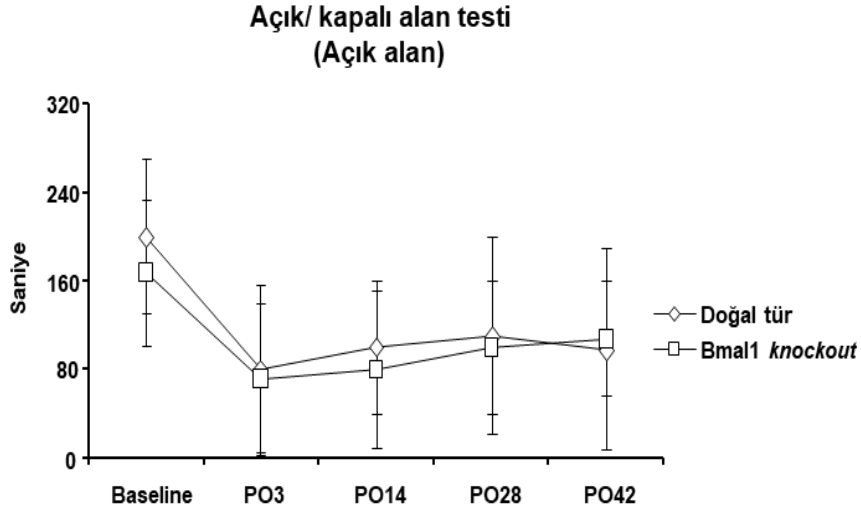


Şekil 4.8.7.3 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan açık/ kapalı alan platformunda açık alanda geçirdiği sürenin analizi.

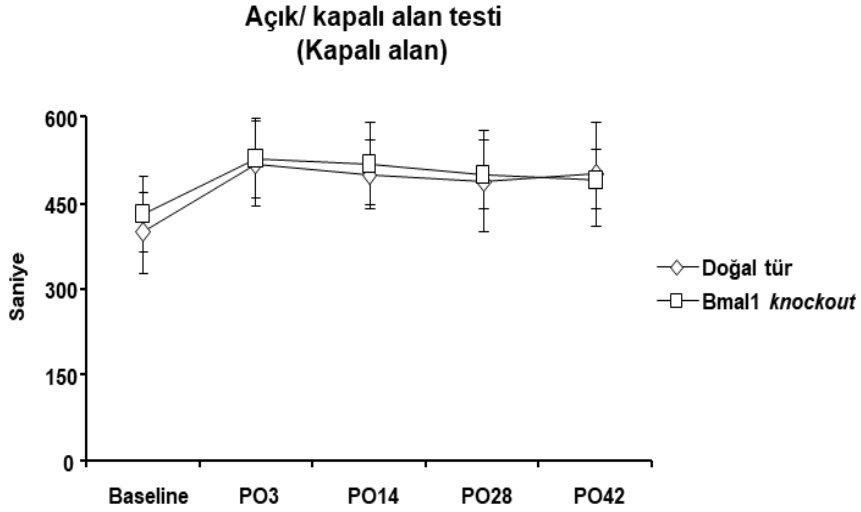


Şekil 4.8.7.4 scRNA ve shBmal1 gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan açık/ kapalı alan platformunda kapalı alanda geçirdiği sürenin analizi.

scRNA ve shBmal1 gruplarındaki farelerin normal fizyolojik koşullar altında açık alanda geçirdikleri süreler iskeminin indüklenmesi ile beraber azaldığı ve testin tekrarlandığı PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde gruplar arasında yapılan istatistiksel analizler neticesinde gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılığın olmadığı gözlemlenmiştir ($p > 0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.7.3 ve 4.8.7.4).



Şekil 4.8.7.5 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan açık/ kapalı alan platformunda açık alanda geçirdiği sürenin analizi.

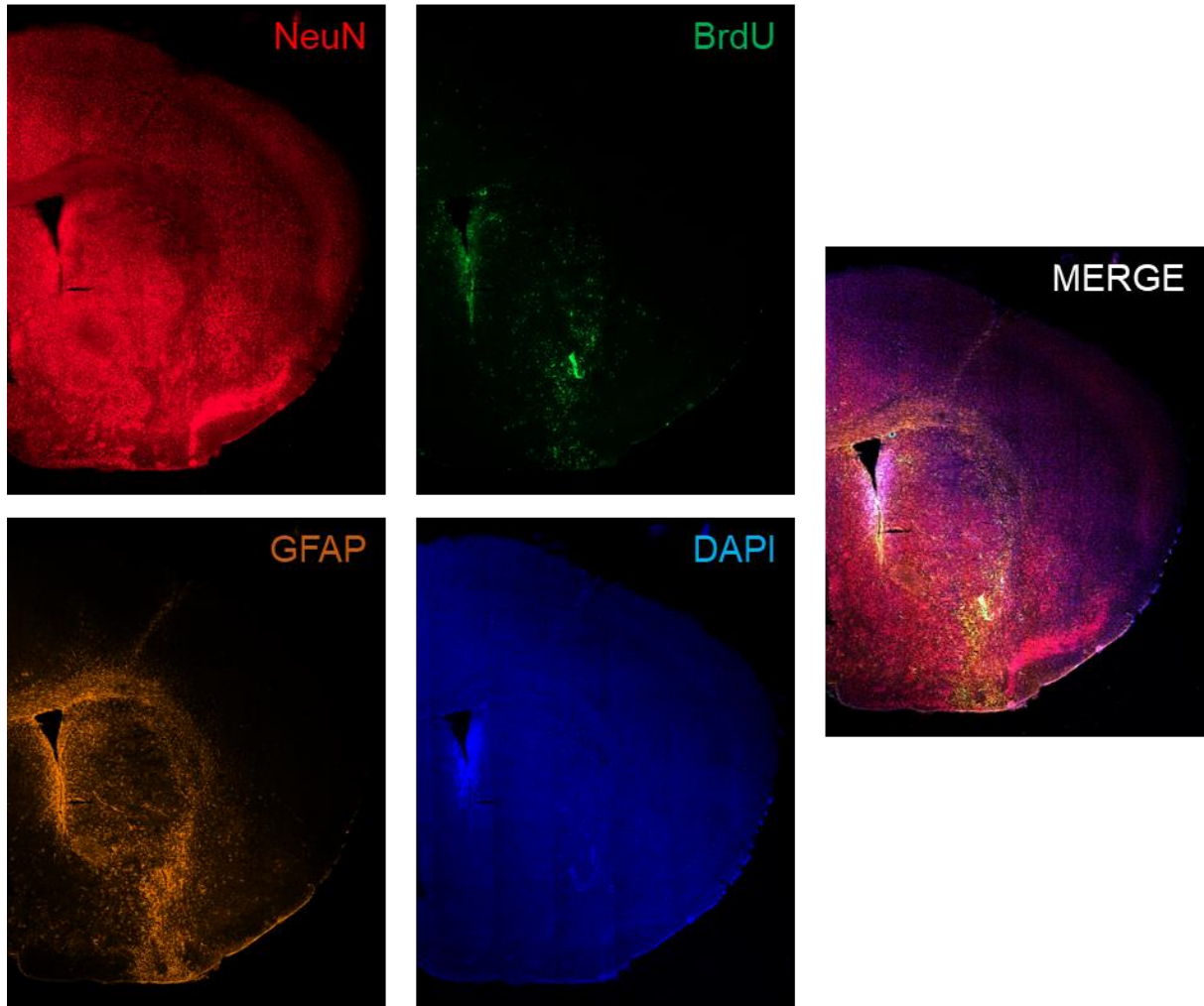


Şekil 4.8.7.6 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarının beyin felci öncesi ve beyin felci sonrasında 3. gün (PO3), 14. gün (PO14), 28. gün (PO28) ve 42. gün (PO42) uygulanan açık/ kapalı alan platformunda kapalı alanda geçirdiği sürenin analizi.

0-maze testinden elde edilen bulgular ile aynı paralellikte aydınlık/ karanlık alan testi aracılığıyla beyin felci operasyonlarından önce yapılan baseline ve beyin felci sonrasında PO3, PO14, PO28 ve PO42. günlerde Doğal tür ve Bmal1 *knockout* fareleri arasında istatistiksel olarak bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$, (independent samples t test) (Şekil 4.8.7.5 ve 4.8.7.6).

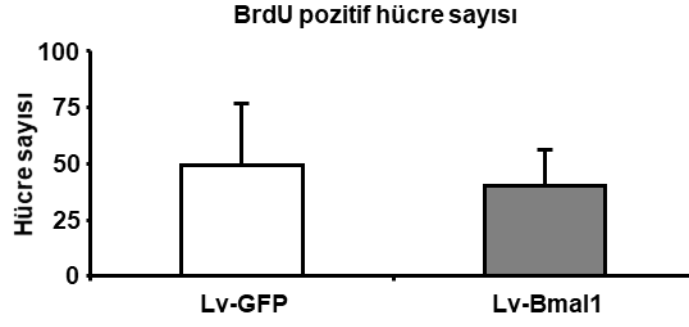
4.9 BrdU pozitif hücrelerin analizi

Proje önerisinde Set 2 olarak belirtilen 30 dk orta serebral arter tıkanması takiben 55 gün reperfüzyon yapılan farelere beyin felci operasyonlarından 3 gün sonra 100 mg/kg dozunda BrdU enjeksiyonu yapılmıştır. Fareler sakrifiye edildikten sonra striatum seviyesinden (Bregma 0) alınan koronal kesitlere proje önerisi yöntem bölümü 5.9.3. BrdU boyaması başlığı altında belirtildiği üzere boyamalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Tek bir kesit üzerinde DAPI (405nm), BrdU (488 nm), GFAP (555 nm) ve NeuN (647 nm) antikorları kullanılarak boyamalar gerçekleştirilmiştir. Boyamalar sonrasında örnekler lazer taramalı konfokal (LSM780, Zeiss) mikroskop aracılığıyla alınmıştır.



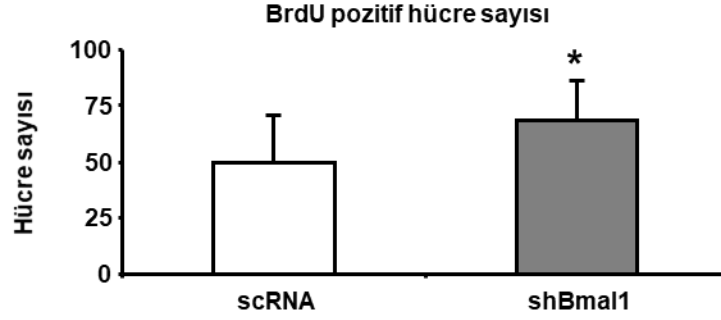
Şekil 4.9.1 İskemik striatum seviyesinde BrdU, GFAP, NeuN ve DAPI boyaması. Floresan görüntüler lazer taramalı konfokal (LSM780, Zeiss) mikroskop aracılığıyla çekilmiştir.

İskemik striatum seviyesinden belirlenen 62.500 μm^2 'lik 9'ar farklı alandan BrdU pozitif hücre sayılmıştır. Hücre sayımı yapılırken BrdU (488 nm) ve DAPI (405 nm) sinyallerinin üst üste geldiği hücreler BrdU pozitif hücre olarak alınmıştır.



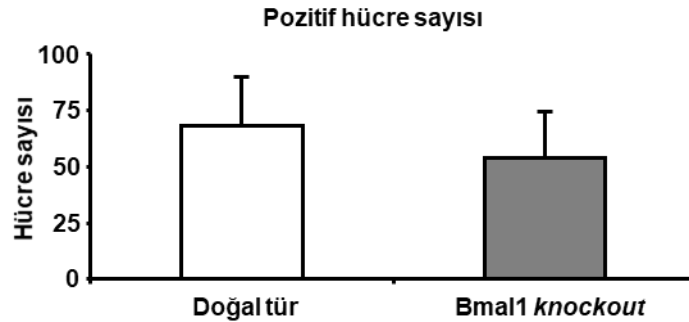
Şekil 4.9.2 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarında BrdU pozitif hücre analizi.

Bmal1 protein seviyesinin artırıldığı Lv-Bmal1 grubundaki BrdU pozitif hücre sayısı Lv-GFP grubuna (Lv-Bmal1 grubunun kontrolü olarak oluşturulmuş grup) kıyasla azaldığı görülmüştür. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizler neticesinde bu değişimin istatistiksel olarak bir anlamlılık taşımadığı gözlemlenmiştir ($p > 0.05$, (*independent samples t test*)).



Şekil 4.9.3 scRNA ve shBmal1 gruplarında BrdU pozitif hücre analizi. * $p < 0.05$ scRNA grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (*independent samples t test*).

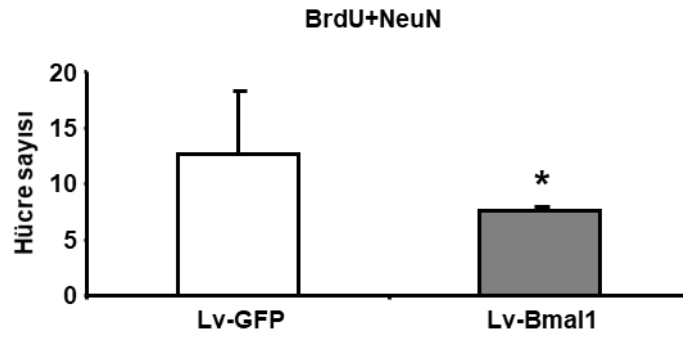
Bmal1 protein seviyesinin azaltıldığı shBmal1 grubundaki BrdU pozitif hücre sayısı scRNA grubuna (shBmal1 grubunun kontrolü olarak oluşturulmuş grup) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür ($p < 0.05$, (*independent samples t test*)). Akut dönem beyin felci verileri dikkate alındığında Bmal1'in inhibisyonu akut dönemde apoptotik hücre sayısını artırırken uzun dönemde BrdU pozitif hücre sayısını arttırmaktadır.



Şekil 4.9.4 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarında BrdU pozitif hücre analizi.

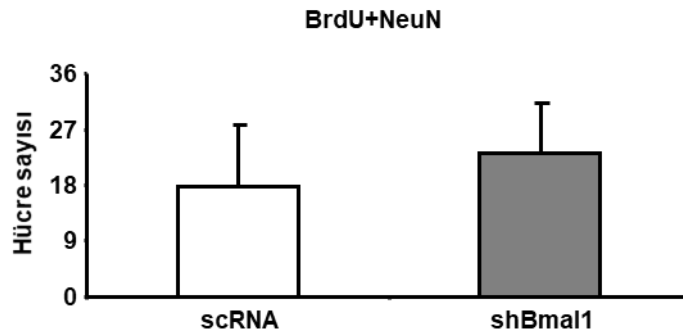
Bmal1 protein ifadesi doğuştan olmayan Bmal1 *knockout* grubundaki farelerde sayılan BrdU pozitif hücre sayısı Doğal tür grubuna kıyasla azaldığı görülmektedir. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizler neticesinde bu değişimin istatistiksel olarak bir anlamlılık taşımadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$, (independent samples t test)).

İskemik striatum seviyesinden belirlenen 62.500 μm^2 'lik 9'ar farklı alandan BrdU + NeuN (neuronal nuclei) pozitif hücreler sayılmıştır. Hücre sayımı yapılırken NeuN (647nm), BrdU (488 nm) ve DAPI (405 nm) sinyallerinin üst üste geldiği hücreler BrdU + NeuN pozitif hücre olarak alınmıştır.



Şekil 4.9.5 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarında BrdU + NeuN pozitif hücre analizi. * $p<0.05$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

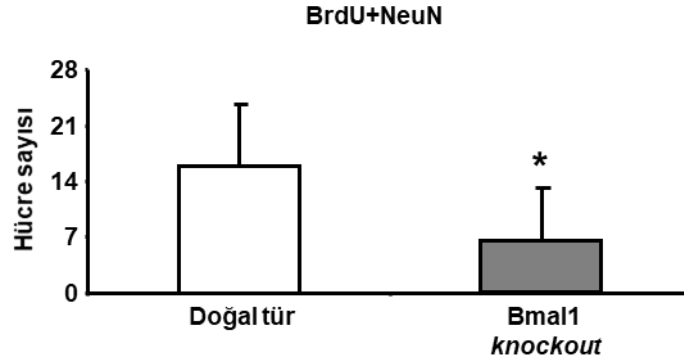
Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarındaki farelerin iskemik striatum seviyesinden sayılan hücreler analiz edildiğinde Bmal1 protein ifadesi artırılmış grupta oluşan yeni nöron (BrdU + NeuN) sayısının Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha az olduğu gösterilmiştir ($p<0.05$, (independent samples t test)).



Şekil 4.9.6 scRNA ve shBmal1 gruplarında BrdU + NeuN pozitif hücre analizi.

scRNA ve shBmal1 gruplarındaki farelerin iskemik striatum seviyesinden sayılan hücreler analiz edildiğinde Bmal1 protein ifadesi azaltılmış grupta oluşan yeni nöron (BrdU +

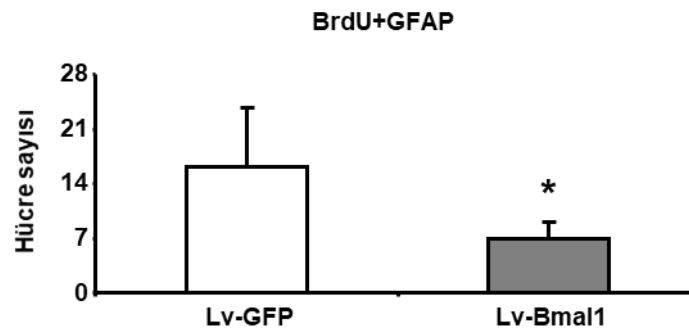
NeuN) sayısının scRNA grubuna daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Fakat bu artış istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık taşımamaktadır ($p>0.05$, (independent samples t test)).



Şekil 4.9.7 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarında BrdU + NeuN pozitif hücre analizi. * $p<0.05$ Doğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarındaki farelerin iskemik striatum seviyesinden sayılan hücreler analiz edildiğinde Bmal1 protein ifadesi hiç olmayan Bmal1 *knockout* grubunda oluşan yeni nöron (BrdU + NeuN) sayısının doğal tür grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha az olduğu gösterilmiştir ($p<0.05$, (independent samples t test)).

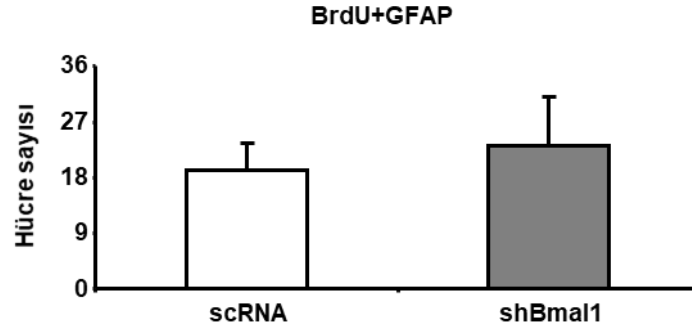
İskemik striatum seviyesinden belirlenen 62.500 μm^2 'lik 9'ar farklı alandan BrdU + GFAP (Glial fibrillary acidic protein) pozitif hücreler sayılmıştır. Hücre sayımı yapılırken GFAP (555 nm), BrdU (488 nm) ve DAPI (405 nm) sinyallerinin üst üste geldiği hücreler BrdU + NeuN pozitif hücre olarak alınmıştır.



Şekil 4.9.8 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarında BrdU + GFAP pozitif hücre analizi. * $p<0.05$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

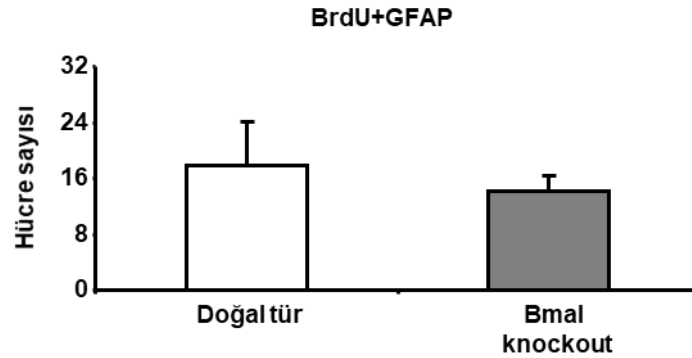
Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarındaki farelerin iskemik striatum seviyesinden sayılan hücreler analiz edildiğinde Bmal1 protein ifadesi artırılmış grupta oluşan yeni glial hücre (BrdU

+ GFAP) sayısının Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha az olduğu gösterilmiştir ($p < 0.05$, (independent samples t test)).



Şekil 4.9.9 scRNA ve shBmal1 gruplarında BrdU + GFAP pozitif hücre analizi.

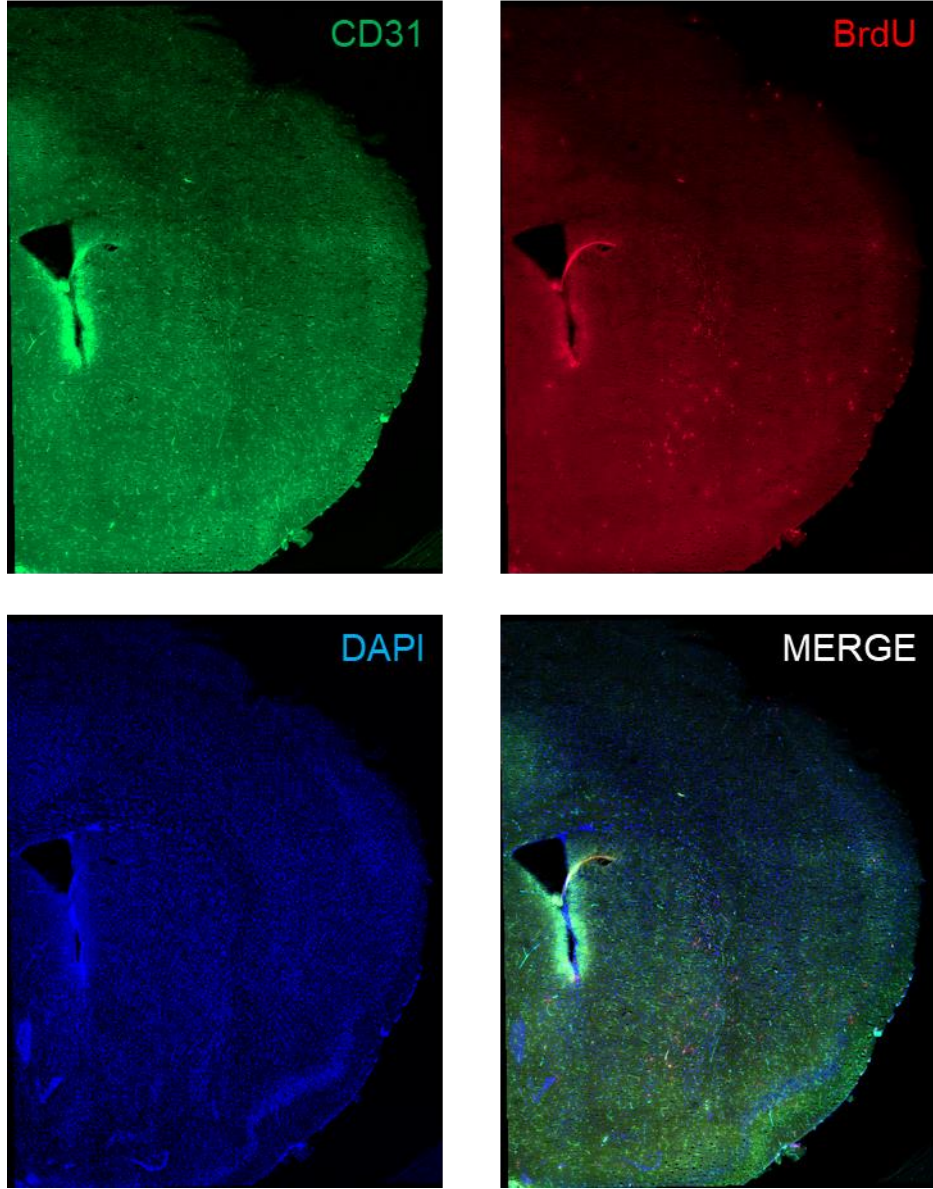
scRNA ve shBmal1 gruplarındaki farelerin iskemik striatum seviyesinden sayılan hücreler analiz edildiğinde Bmal1 protein ifadesi azaltılmış grupta oluşan yeni glial hücre (BrdU + GFAP) sayısının scRNA grubuna daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Fakat bu artış istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık taşımamaktadır ($p > 0.05$, (independent samples t test)).



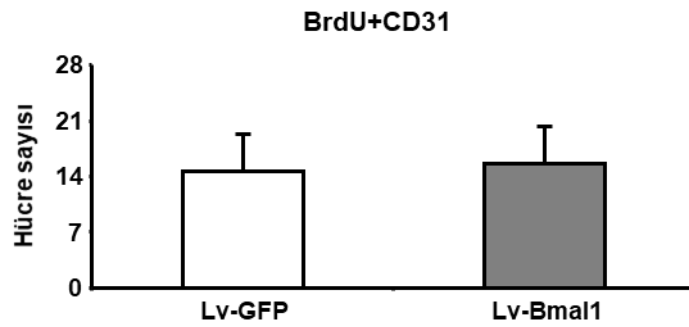
Şekil 4.9.10 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarında BrdU + GFAP pozitif hücre analizi.

Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarındaki farelerin iskemik striatum seviyesinden sayılan hücreler analiz edildiğinde Bmal1 protein bulunmayan grupta (Bmal1 *knockout*) oluşan yeni glial hücre (BrdU + GFAP) sayısının scRNA grubuna daha az olduğu gözlemlenmiştir. Fakat bu azalış istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık taşımamaktadır ($p > 0.05$, (independent samples t test)).

İskemik striatum seviyesinden belirlenen 62.500 μm^2 'lik 9'ar farklı alandan BrdU + CD31 (Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)/ cluster of differentiation 31) pozitif hücreler sayılmıştır. Hücre sayımı yapılırken BrdU (647 nm), CD31 (488 nm) ve DAPI (405 nm) sinyallerinin üst üste geldiği hücreler BrdU + CD31 pozitif hücre olarak alınmıştır.

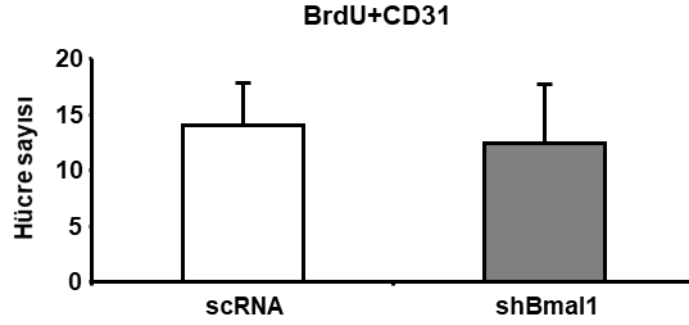


Şekil 4.9.11 İskemik striatum seviyesinde BrdU, CD31 ve DAPI boyaması. Floresan görüntüler lazer taramalı konfokal (LSM780, Zeiss) mikroskop aracılığıyla çekilmiştir.



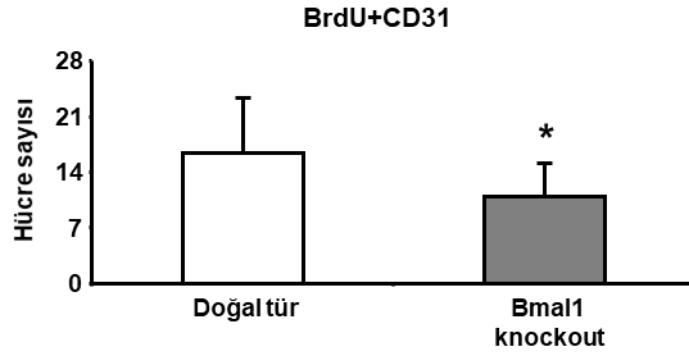
Şekil 4.9.12 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarında BrdU + CD31 pozitif hücre analizi.

Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarındaki farelerin iskemik striatum seviyesinden sayılan hücreler analiz edildiğinde Bmal1 protein ifadesi azaltılmış grupta (shBmal1) ve scRNA grubunda yeni oluşan damar sayısı bakımından herhangi bir fark gözlemlenmemiştir ($p>0.05$, (independent samples t test)).



Şekil 4.9.13 scRNA ve shBmal1 gruplarında BrdU + CD31 pozitif hücre analizi.

scRNA ve shBmal1 gruplarındaki farelerin iskemik striatum seviyesinden sayılan hücreler analiz edildiğinde Bmal1 protein ifadesi azaltılmış grupta (shBmal1) ve scRNA grubunda yeni oluşan damar sayısı bakımından herhangi bir fark gözlemlenmemiştir ($p>0.05$, (independent samples t test)).

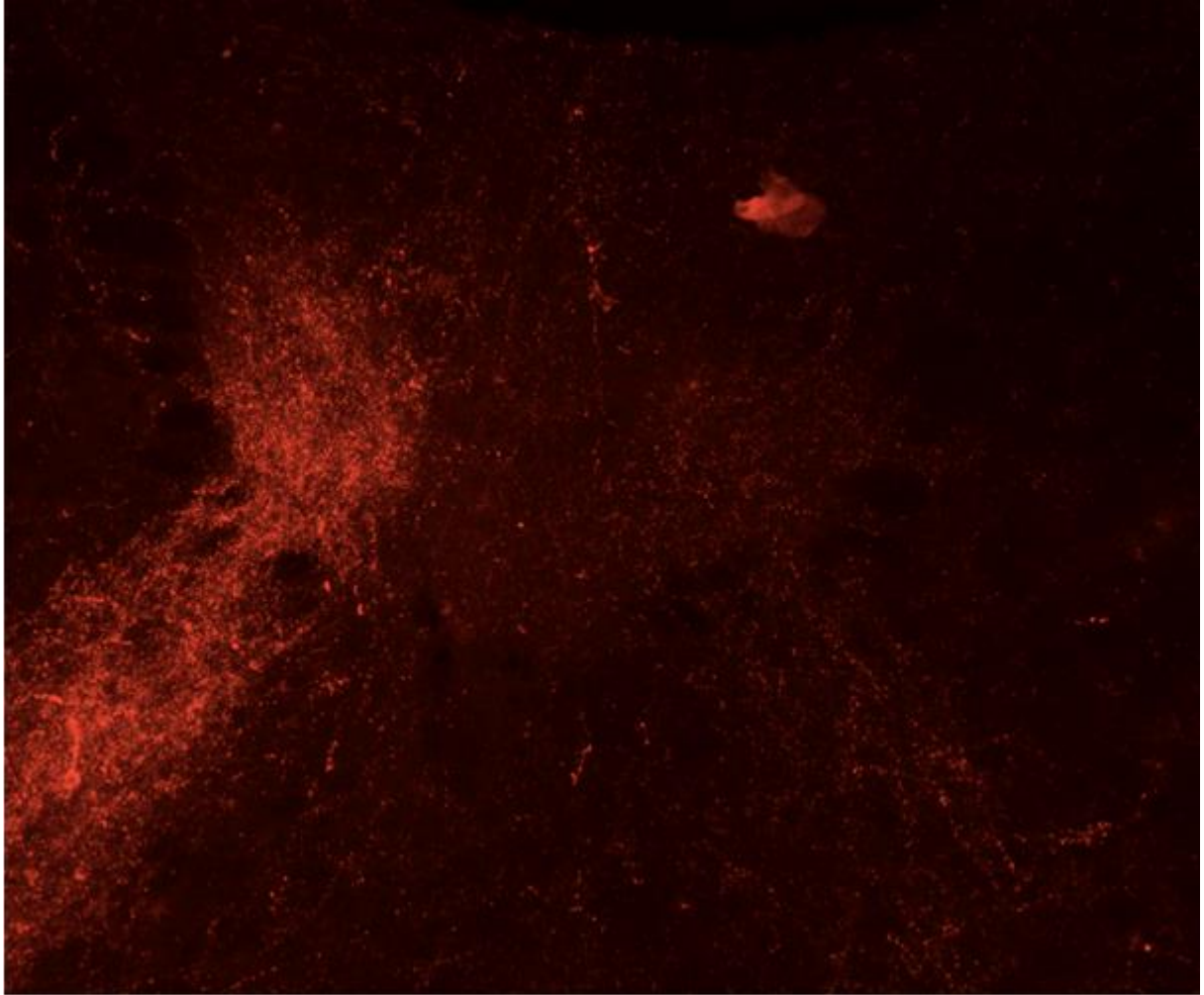


Şekil 4.9.14 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarında BrdU + CD31 pozitif hücre analizi. * $p<0.05$ Doğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

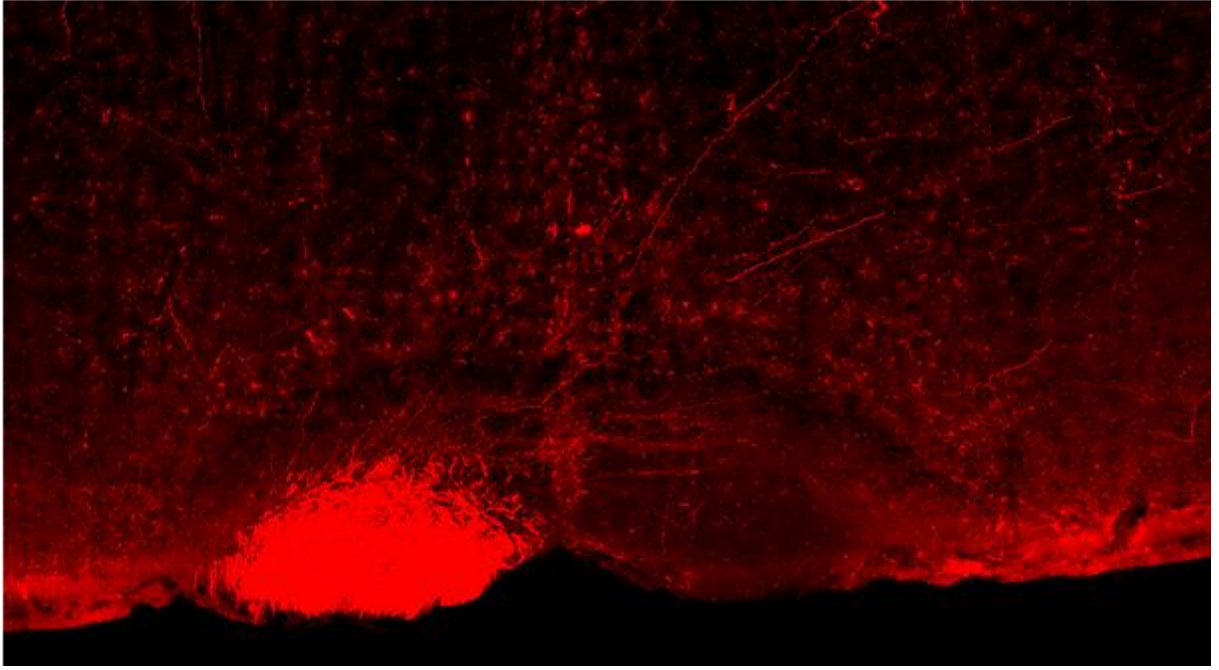
Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarındaki farelerin iskemik striatum seviyesinden sayılan hücreler analiz edildiğinde Bmal1 protein ifadesi hiç olmayan Bmal1 *knockout* grubunda oluşan yeni damar sayısının (BrdU + CD31) sayısının doğal tür grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha az olduğu gösterilmiştir ($p<0.05$, (independent samples t test)).

4.10. Aksonal geçişlerin analizi

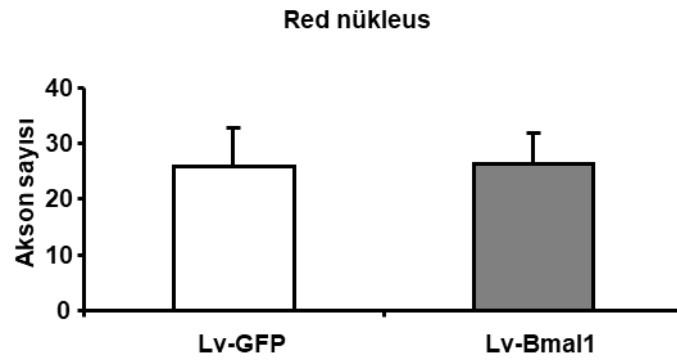
İskemiden sonra kontralateral hemisferden ipsilateral hemisfere uzatılan aksonların değeriendirilebilmesi için Set 2 kapsamında davranış deneyleri uygulana farelere beyin felcinden 45 gün sonra biyotinlenmiş dekstran amin (BDA, D1956, Invitrogen) uygulanmıştır. Bu amaçla gaz anestezi sistemi ile anesteziye alınan fareler stereotaktik çerçeveye (frame) yerleştirilmiş ve sonrasında kafatası tur aleti kullanılarak kontralateral hemisferde bregmaya 0,5 mm rostral ve 2,5 mm lateral koordinatlar delinmiştir. Sonrasında hamilton enjektörü vasıtasıyla %10 biyotinlenmiş dekstran amin (BDA, D1956, Invitrogen) kontralateral hemisfere uygulanmıştır. BDA enjeksiyonundan sonra fareler BDA'nın akson boyunca tamamen taşınabilmesi için 10 gün süresince yaşatılmış ve sonrasında kardiyak perfüzyon fiksasyon yöntemiyle sakrifiye edilmişlerdir. Sakrifiye edilen farelerden alınan beyinler cryostat cihazı aracılığıyla işlendikten sonra red nükleus ve fasial nükleus seviyesinden alınan koronal kesitlere BDA boyaması yapılmıştır.



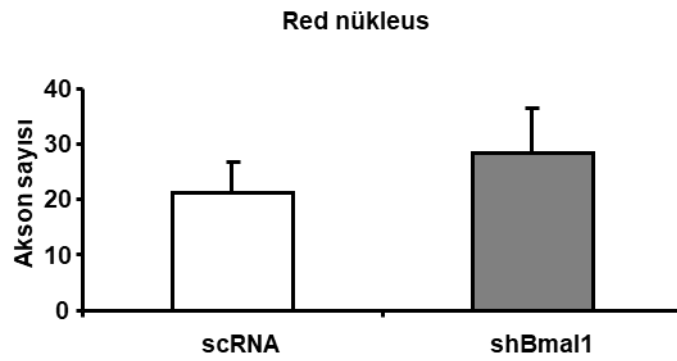
Şekil 4.10.1 Red nükleus seviyesinden aksonal geçişlerin analizi. Floresan görüntüler lazer taramalı konfokal (LSM780, Zeiss) mikroskop aracılığıyla çekilmiştir.



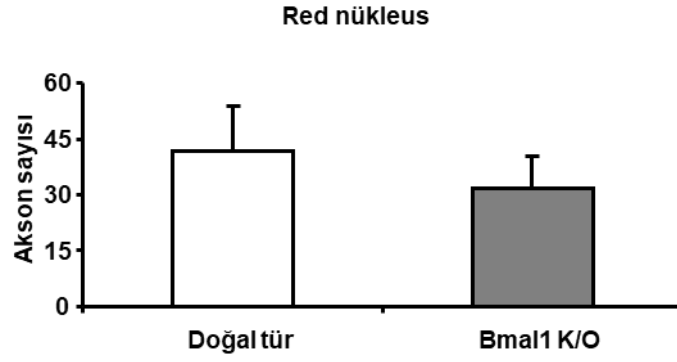
Şekil 4.10.2 Facial nükleus seviyesinden aksonal geçişlerin analizi. Floresan görüntüler lazer taramalı konfokal (LSM780, Zeiss) mikroskop aracılığıyla çekilmiştir.



Şekil 4.10.3 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarında red nükleus seviyesinde kontralateral (hasarsız) hemisferden ipsilateral (hasarlı) hemisfere geçen akson sayısının analizi.

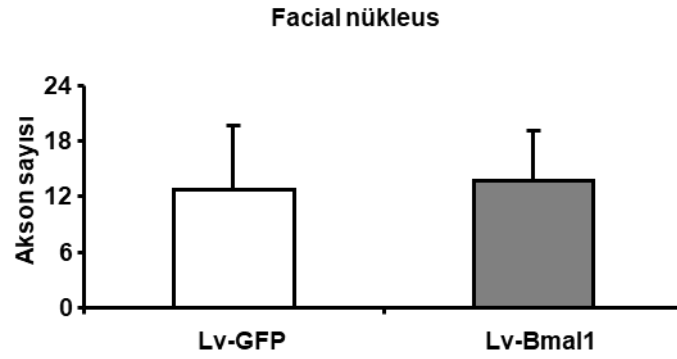


Şekil 4.10.4 scRNA ve shBmal1 gruplarında red nükleus seviyesinde kontralateral (hasarsız) hemisferden ipsilateral (hasarlı) hemisfere geçen akson sayısının analizi.

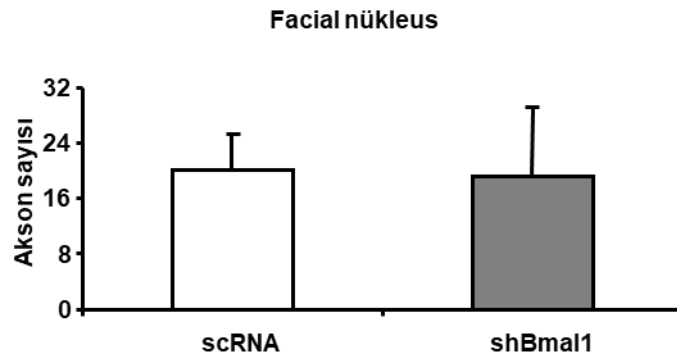


Şekil 4.10.5 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarında red nükleus seviyesinde kontralateral (hasarsız) hemisferden ipsilateral (hasarlı) hemisfere geçen akson sayısının analizi.

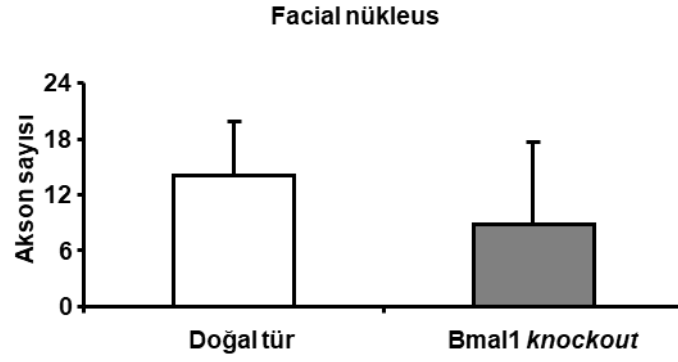
Beyin felci sonrasında kontralateral hemisferden ipsilateral hemisfere uzatılan akson sayısının artması veya azalması direkt olarak beyin plastisitesi ile alakalıdır. Projemiz kapsamında red nükleus seviyesinden analiz edilen aksonal geçişlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenememiştir ($p > 0.05$, (*independent samples t test*)).



Şekil 4.10.6 Lv-GFP ve Lv-Bmal1 *knockout* gruplarında facial nükleus seviyesinde kontralateral (hasarsız) hemisferden ipsilateral (hasarlı) hemisfere geçen akson sayısının analizi.



Şekil 4.10.7 scRNA ve shBmal1 gruplarında facial nükleus seviyesinde kontralateral (hasarsız) hemisferden ipsilateral (hasarlı) hemisfere geçen akson sayısının analizi.

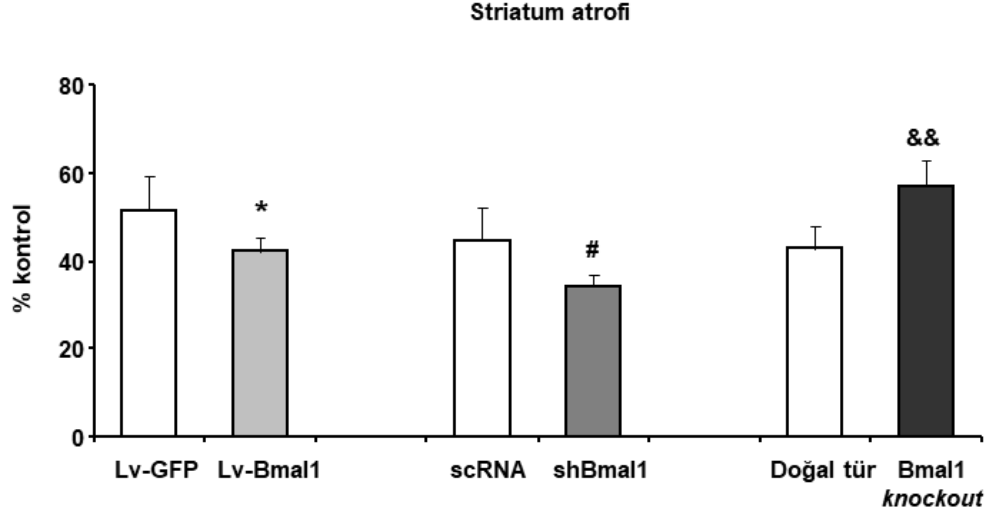


Şekil 4.10.8 Doğal tür ve Bmal1 *knockout* gruplarında facial nükleus seviyesinde kontralateral (hasarsız) hemisferden ipsilateral (hasarlı) hemisfere geçen akson sayısının analizi.

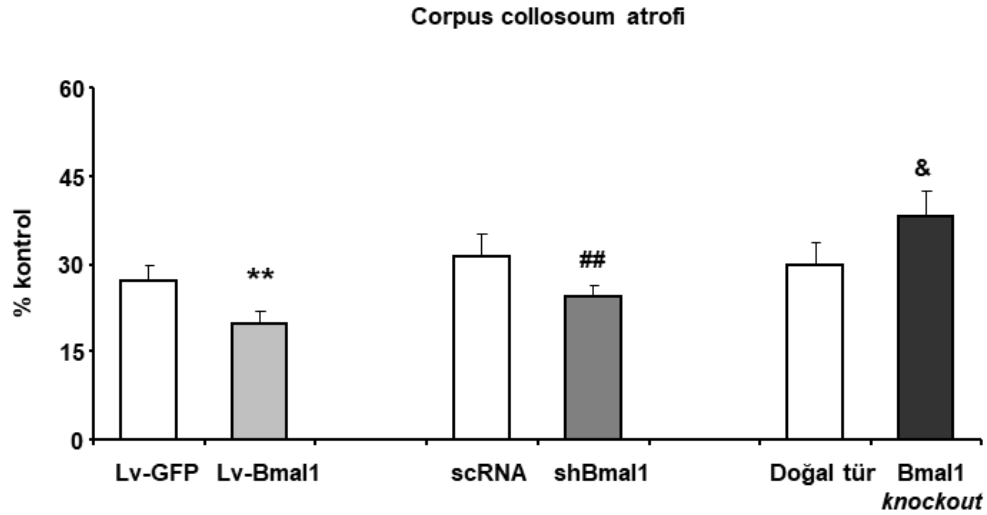
Beyin felci sonrasında kontralateral hemisferden ipsilateral hemisfere uzatılan akson sayısının artması veya azalması direkt olarak beyin plastisitesi ile alakalıdır. Projemiz kapsamında facial nükleus seviyesinden analiz edilen aksonal geçişlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenememiştir ($p > 0.05$, (*independent samples t test*)).

4.11. Atrofi ve glial yaranın analizi

30 dk orta serebral arter tıkanması takiben 55 gün reperfüzyon gerçekleştirilen farelerin striatum seviyesinden alınan koronal kesitlere cresyl violet boyaması yapılmıştır. Sonrasında bu kesitlerden proje önerisi yöntem bölümünde belirtildiği şekliyle striatumdan ve korpuz kallozumdan atrofi hesaplanmıştır.



Şekil 4.11.1 Striatumda meydana gelen atrofinin analizi. * $p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre, # $p < 0.05$ scRNA grubuna göre, && $p < 0.01$ Doğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

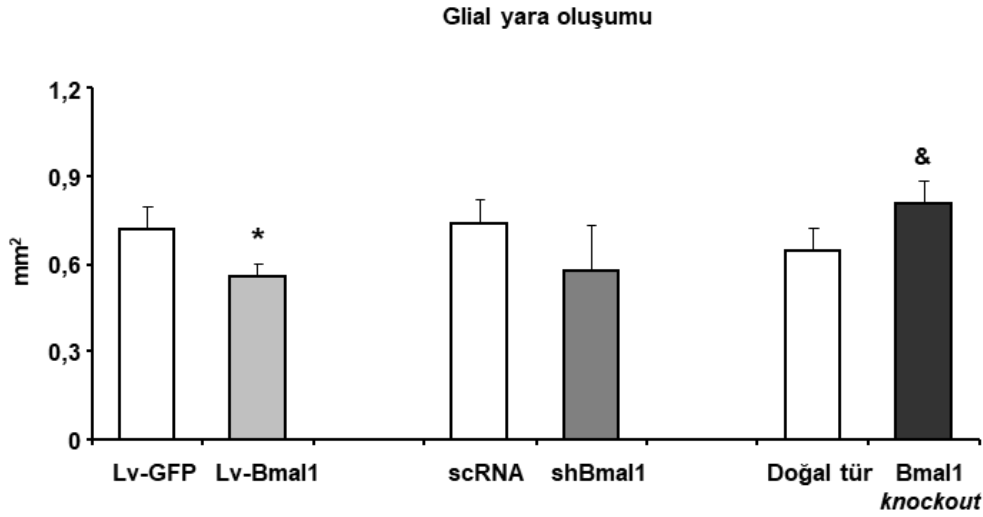


Şekil 4.11.2 Korpuz kallozumda meydana gelen atrofinin analizi. ** $p < 0.01$ Lv-GFP grubuna göre, ## $p < 0.01$ scRNA grubuna göre, & $p < 0.05$ Doğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

Bmal1 protein seviyesinin artmasına veya azalmasına bağlı olarak hem striatum hem de korpuz kallozumda meydana gelen atrofi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmaktadır.

Bmal1 knockot farelerde ise hem striatum hem de korpus kallozumda görülen atrofi miktarı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmaktadır.

Gliyal yara iskemik beyin hasarına yanıt olarak gelişmektedir. Gliyal yaranın oluşumunda; astrositler reaktif astrogliaza dönüşür ve beyin hasarının etrafını sararak hasarın daha fazla yayılmasını engeller. Bu bariyer hem fiziksel hem de kimyasal (kondroitin sülfat proteoglikanların üretimi) bariyerinin oluşumuyla sonuçlanarak beyin hasarının yayılmasını engeller. Striatum seviyesinden alınan koronla beyin kesitlerine GFAP boyaması yapılarak gliyal hücrelerin dağıldıkları alanlar hesaplanmıştır.



Şekil 4.11.3 Gliyal yara analizi. * $p < 0.01$ Lv-GFP grubuna göre, & $p < 0.05$ Doğal tür grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (independent samples t test).

Bmal1 protein seviyesinin artmasıyla gliyal yara oluşumunun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra Bmal1 protein seviyesinin baskılanması da gliyal yara oluşumunu azaltmakta fakat bu azalma istatistiksel olarak bir anlamlılık taşımamaktadır. Ek olarak Bmal1 *knockout* farelerde gliyal yara oluşumun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sirkadiyen ritme bağılı olarak gün içerisinde değişen kalp ritmi, hormonal değişim, pıhtılaşma gibi faktörler serebrovasküler hastalıkların tetiklenmesine neden olmaktadır (Schallner vd., 2017). Sirkadiyen ritim, organizmaların iç fizyolojik süreçlerini dış ortamdan gelen uyarılara bağılı olarak hassas bir şekilde senkronize eden biyolojik bir saattir. Bu biyolojik saat gün içerisindeki aydınlık-karanlık döngüsü, mevsimsel değişiklikler ve beslenme gibi dış uyarılara bağılı olarak kendi ritmini düzenlemektedir (Duffy vd., 2009; Fisk vd., 2018). Bunun yanı sıra sirkadiyen ritmin, nörodejeneratif hastalıkların mekanizmalarında da aktif bir şekilde rol aldığı düşünülmektedir. Buna bağılı olarak, 2018 yılında yayınlanan bir çalışmada sirkadiyen ritmin beyin felci sonrasında gelişen hasar mekanizmaları üzerine olan etkileri gösterilmiştir (Beker vd., 2018). Ayrıca yine aynı çalışma, sirkadiyen ritmin belirlenmesinde önemli bir rolü bulunan Bmal1'in beyin felci patofizyolojisinde önemli bir rolünün olabileceğine dair kuvvetli bulgular içermektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada sirkadiyen ritmin temel transkripsiyon faktörlerinden Bmal1'in beyin felci sonrasında gelişen nöronal hasar, plastisite ve fonksiyonel geri kazanım üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bmal1'in beyin felcindeki rolünü görebilmek için Bmal1 protein seviyesi arttığında (Lv-Bmal1), azaldığında (shBmal1) veya bu proteinin hiç olmadığı Bmal1 *knockout* (Bmal1 geninde yapılan bir mutasyon sonucunda Bmal1 protein ifadesi olmayan transgenik farelerde) farelere orta serebral arter tıkanması metodu uygulanmıştır. Bu sayede (i) Bmal1'in iskemik beyin felci sonrası nöronal sağkalım, apoptotik hücre ölümü ve enflamasyonda rol alan mikrogliya aktivasyonu üzerine olan etkileri, (ii) Bmal1'in beyin felci sonrası akut dönemde hücre içi sinyal iletim yollarından Akt, Erk-1/-2 ve mTOR sinyal yolları ve sirkadiyen ritim proteinlerinden Bmal1, Bmal2, Per I, Per II ve Clock proteinleri üzerine etkileri, (iii) yapmış olduğumuz davranış deneyleri aracılığıyla beyin felci sonrası fonksiyonel geri kazanım, motor koordinasyon, lokomotor aktivite, anksiyete ve depresyon üzerine etkilerinin farklı zaman noktalarında değerlendirilmesi, (iv) iskemi sonrasında yeni oluşan ve farklılaşan hücrelerin takibi yapılarak Bmal1'in nörogenez ve anjiyogenez üzerine etkileri incelenmesi, uzun dönem beyin felci sonrası gelişen ve hasar etrafında oluşan glial yara ile korpus kallozum ve striatumda meydana gelen atrofinin değerlendirilmesi, (vi) motor kortekse uygulanacak ve anterograd taşınan tracer enjeksiyonu sonrasında hasarsız hemisferden hasarlı hemisfere aksonların projeksiyonlarının değerlendirilmesiyle beyin plastisitesinin analizi, (vii) aksonal büyümeyi ve beyin plastisitesini engelleyen proteinlerin seviyelerinin (brevican, versican, efrin B1, efrin B2) iskemik striatum seviyesinden değerlendirilmesi, (viii) Bmal1 proteininin diğer proteinlerle etkileşiminin

karakterizasyonu için immünopresipitasyon yöntemi ile Bmal1 proteiniyle etkileşim içinde olan proteinlerin çöktürülüp geniş ölçekli proteomik analiz vasıtasıyla belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Projemiz kapsamında Bmal1 protein seviyesini arttırmak veya azaltmak amacıyla lentiviral vektörler kullanılmıştır. Çünkü son yıllarda lentiviral vektörler aracılığıyla gen transferi yöntemi çeşitli hastalıkların tedavisinde etkin bir şekilde kullanılabilmektedir (Gan vd., 2013). 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 (Naldini vd., 1996). Moleküler klonlama çalışmaları sonucunda üretilen virüsler vasıtasıyla farelerin striatum seviyesinde Bmal1 protein seviyesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırılmış veya azaltılmıştır. Farelere virüs partiülleri beyin içi yöntemle uygulandıktan 7 gün sonra orta serebral arter tıkanması metodu kullanılarak farelere beyin felci operasyonları gerçekleştirilmiştir.

Projemiz hipotez olarak Bmal1 proteinin beyin felci sonrası akut dönem (30 dk orta serebral arter tıkanması takiben 3 gün reperfüzyon) ve uzun dönem (30 dk orta serebral arter tıkanması takiben 55 gün reperfüzyon) etkilerini görmeyi amaçlamıştır. Beyin felci vakalarının %80'i orta serebral arter tıkanması sonucu gerçekleşir. Kliniği en iyi şekilde taklit edebilmek amacıyla farelerde OSAO modeli uygulanmaktadır. Bu kapsamda, farelere 30 dakikalık orta serebral arter operasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha uzun ve dolayısıyla daha büyük çaplı hasar vermek yerine, geri döndürülebilir bir hasar için 30 dakikalık beyin felci metodu uygulanmıştır (Beker vd., 2020; Kilic vd., 2014). 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. Beyin felci operasyonlarının tekrar edilebilirliğini ve operasyonların başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacıyla farelerin kafatası üzerinden LDF kaydı alınmıştır. Filamentin orta serebral arterin girişini tıkamasıyla beraber kan akımının azaldığı ve filamentin 30 dk sonrasında geri çekilmesiyle beraber bölgesel kanlanmanın tekrardan sağlandığı görülmüştür.

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 (Ginsberg, 1997). 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 (Astrup vd., 1981; Yao vd., 2001; Zechariah vd., 2013). Nöronların sağ kalımı ya da apoptoz ile hücre ölümünün gerçekleşmesi, çeşitli iç ve dış etkenlere bağlıdır (Lakhan vd., 2009). Bu çalışma kapsamında, Bmal1 ifadesini artırmanın ya da baskılamanın nöronal sağkalıma etkisini araştırmak adına; beyin felci operasyonundan 72 saat sonra kurban edilen farelerden alınan beyin kesitlerine NeuN analizi yapılmıştır. Elde edilen bulgular Bmal1 protein seviyesinin lentiviral vektörler aracılığıyla azaltılması iskemik alandaki nöronal sağkalımı azalttığı, bmal1 protein ifadesinin artmasının ise herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Ayrıca Bmal1 *knockout* farelerde ise hücresel sağkalım bakımından bir fark gözlemlenmemiştir.

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 (Broughton vd., 2009). Apoptoz sürecindeki hücrelerde DNA hasarı sonucu DNA kırıkları bulunduğu için, bu hücreleri belirlemek amacıyla TUNEL analizi gerçekleştirilir. TUNEL pozitif hücreler, apoptotik hücreler olarak tanımlanabilir (Hara vd., 1997; Namura vd., 1998). 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). shBmal 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. Bmal1 *knockout* farelerde ise apoptotik hücre sayısının istatistiksel olmasa da bir miktar azdığı gözlemlenmiştir.

Bmal1 ile etkileşimi olan proteinleri belirlemek amacıyla eş-immünpresipitasyon analizi gerçekleştirildi. Bmal1 ile direkt ya da dolaylı olarak bağlantılı olan proteinler belirlenmiştir. Belirlenen proteinlerin analizi için PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships; <http://www.pantherdb.org/>) programı kullanılarak sınıflandırılmıştır (Beker vd., 2019). Protein sınıfı olarak kategorilendirildiğinde, bu proteinlerin büyük bir kısmının nükleik asit bağlama proteini olduğu belirlenmiştir. Moleküler aktivite sınıflandırmasında ise bağlama, 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, prekürsor iyonlar dizisel küçük kütle aralıklarına (5-25 Da) ayrılarak; her kütle aralığındaki prekürsor 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 proje kapsamında yapılan sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi analizleri, çözünürlük (Resolution) HDMSE 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 (Beker vd., 2019; Beker vd., 2018). 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 ilei Bmal1 *knockout* grubu, doğal tür ile kıyaslanmıştır. Bu sayede beyin felci sonrasında Bmal1 protein seviyesinin artmasına, azalmasına veya ortamda hiç bulunmamasına bağlı olarak değişen proteom tespit edilmiştir. Proje kapsamında yüksek miktarda protein tanımlanmış olduğunda dolayı bu proteinlerin ilerleyen çalışmalara yön vereceği düşünülmektedir.

Sirkadiyen ritmin ve devam ettirilmesinden sorumlu olan proteinlerin (BMAL1, BMAL2, CLOCK, PER-I ve PER-II) analizleri Western blot analizleriyle gösterilmiştir. Lentiviral vektörler aracılığıyla Bmal1 protein seviyesi artırılmış farelerde beyin felci sonrasında Bmal1 protein seviyesinin halen artmış bir şekilde olduğu gözlemlenirken inhibe edilen grupta ise Bmal1 prtein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde baskılanmış olduğu görülmüştür. Bmal1 *knockout* farelerde ise beklenildiği üzere herhangi bir Bmal1 protein ifadesine rastlanılmamıştır. Bmal2 protein seviyesinden elde edilen bulgular önemli bir şekilde dikkat çekmektedir. Bmal1 protein seviyesinin artmasına bağlı olarak inhibe olduğu gözlemlenen Bmal2'nin, Bmal1 protein seviyesinin baskılandığı grupta dikkat çeken bir artışı bulunmaktadır. Bu bilgilere ek olarak Bmal1 *knockout* farelerde Bmal2 protein seviyesinin

oldupu fakat bu seviyenin doğal türe kıyasla daha az olduğu gözlemlenmiştir. CLOCK proteinini BMAL1'in heterodimer partneri olarak görev almakta olup hücre içerisinde sirkadiyen ritmin belirlenmesinde önemli bir rolü bulunmaktadır (Yi vd., 2021). BMAL1 protein seviyesinde olduğu gibi CLOCK protein seviyesinde regüle olmaktadır. BMAL1/CLOCK heterodimer partneri hücre içerisinde Period (Per1, Per2 ve Per3) ve Cryptochrome (Cry1 ve Cry2) genlerinin ifade edilmesini kontrol etmektedir. Negatif geribildirim mekanizması dahilinde Cry ve Per genleri Bmal1 ve Clock genlerinin aktivitelerini kontrol etmektedir (Spencer vd., 2013; Yi vd., 2021). Bu bilgiler dahilinde Bmal1 ve Clock aktivasyonuna bağlı olarak Per1 ve Per2 protein seviyelerinin azaldığı, Bmal1 ve Clock inhibisyonuna bağlı olarak da arttığı gözlemlenmiştir.

Hücre sağkalım kinazı olarak bilinen AKT, ERK-1/-2 ve mTOR proteinleri hücre içerisinde birçok önemli süreçte görev almaktadır. Nörodejeneratif süreçler AKT ve ERK proteinlerin fosforlanarak aktifleşmesine bağlı olarak anti-enflamatuvar ve aktioksidatif yanıtın arttığı bilinmektedir (Chuang vd., 2020; Kilic vd., 2017). Bu proteinlerin alt iletim yolağında bulunan mTOR protein seviyesinin artması da yine hücre sağkalım aktivitelerini artırarak nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde önemli bir hedef haline gelmektedir. Bmal1 protein ifadesinin artmasına bağlı olarak AKT ve ERK protein seviyeleri değişmezken mTOR protein seviyesi artmaktadır. Bmal1 protein seviyesinin baskılanmasıyla beraber sağkalım kinazı AKT ve ERK protein seviyeleri artarken mTOR protein seviyesi azalmaktadır. Bmal1 *knockout* farelerde ise AKT, ERK ve mTOR protein seviyeleri baskılanmaktadır.

Nitrik oksit sentazlar (NOS) NADPH yoluyla nitrik oksidi (NO) sentezleyen ve ortaya çıkan yan ürün L-sitrülin ile L-argininin oksijene bağımlı tüketimini sentezleyen bir oksidoredüktaz ailesidir (Boettger vd., 2007). NOS ailesinin 3 farklı izoformu bulunmaktadır ve NOS izoformları eksprese edildikleri hücre tipi, hücre içi hedefleme ve enzim aktivitesini düzenleyen transkripsiyonel ve translasyon sonrası mekanizmalarla fonksiyonel olarak ayırt edilebilmektedir (Lacza vd., 2003; Yilmaz vd., 2020). İndüklenebilir NOS (iNOS) seviyesi Bmal1 protein seviyesinin değişimine bağlı olarak beyin felci sonrasında azalmaktadır. Buna bağlı olarak beyin hasarının azalması beklenmektedir. Endotelial NOS (eNOS) seviyesi Bmal1 aktivasyonuna bağlı olarak azalırken Bmal1 *knockout* farelerde önemli bir şekilde arttığı görülmüştür. Nöronal NOS (nNOS) protein seviyesi ise iNOS protein seviyesinde olduğu gibi Bmal1 protein seviyesinin artmasına, azalmasına veya ortamda hiç bulunmamasına bağlı olarak azalmaktadır.

Klinikte görülen beyin felci vakalarının yaklaşık olarak üçte birlik bir kısmı ölüm ile sonuçlanırken hayatta kalanlar ise yaşamlarının geri kalanlarını ciddi nörolojik kısıtlamalarla

sürdürmek zorunda kalmaktadır. Hayatta kalanların sağlık giderleri ve evde bakım maliyetleri düşünüldüğünde hem ülke hem de aile ekonomisine önemli bir yük getirmektedir. Bu nedenle beyin felci sonrasında hastaların nörolojik ve fonksiyonel geri kazanımları önemli bir tedavi alanı olarak ön plana çıkmaktadır. Yapmış olduğumuz projede uygulanana davranış deneyleri aracılığıyla farelerin lokomotor aktivite, fonksiyonel geri kazanım ve anksiyete değerleri ölçülmüştür. Açık alan testi verilerine göre Bmal1 protein seviyesinin artması farelerin test süresince kat ettikleri mesafeyi, ortalama hızı, merkez alanında geçirdiği süreyi ve geçiş alanında geçirdiği süreyi artırırken kenar bölgesinde geçirdiği süreyi azaltmaktadır. Fakat bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bmal1 protein seviyesinin azaltılmasına bağlı olarak ortalama hız, hareketlilik süresi azalırken merkez alanında geçirdiği süre, geçiş alanında geçirdiği süre ve kenar bölgesinde geçirdiği süre artmaktadır. Fakat bu değişimler de istatistiksel olarak bir anlam taşımamaktadır. Bmal1 *knockout* farelerde ise davranış deneylerine bağlı olarak lokomotor aktivite parametrelerinde herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir. Bmal1 regülasyonuna bağlı olarak beyin felci sonrasında gelişen anksiyete üzerine bir etkisi bulunmamaktadır. Ayrıca Rota-Rod testi aracılığıyla yapılan motor koordinasyon testlerinde de Bmal1'in bir etkisi gözlemlenmiştir. Bmal1 protein seviyesinin artışı farelerde hem tek el hem de çift elde fonksiyonel geri kazanım sağlamıştır.

Beyin felci sonrasında nöroenez, gliogenezi ve anjiyogenezi analiz edebilmek için farelere beyin hasarından üç gün sonra üçer gün aralıklarla 100 mg/kg dozunda BrdU enjeksiyonları yapılmıştır. BrdU hücreler tarafından BrdUTP'ye fosforile edilmektedir. Bu öncü, deoksitimidin trifosfat (dTTP) yerine S fazı sırasında yeni sentezlenen DNA'ya entegre olmaktadır. Bu sayede beyin hasarı sonrasında yeni oluşan hücreler BrdU'ya spesifik inkincil antikorlar kullanılarak görüntülenebilmektedir (Beker vd., 2020; Caglayan vd., 2019; Surugiu vd., 2018). Projemiz kapsamında yapılan BrdU analizleri neticesinde Bmal protein seviyesinin baskılanması yeni oluşan hücre sayısını arttırmaktadır. Fakat bu gene doğuştan sahip olmayan Bmal1 *knockout* farelerde ise yeni oluşan hücre sayısı bir miktar azalmaktadır. Yeni oluşan hücrelerden nöroenez ve gliogenezi belirleyebilmek için BrdU boyaması NeuN ve GFAP antikorları ile beraber boyanıp analiz edilmiştir. Bmal1 protein ifadesinin arttırımı uzun dönemde hem nöroenez (BrdU + NeuN) hem de gliogenezi (BrdU+ GFAP) baskıladı görülmektedir. Bmal1 protein ifadesinin azaltılması ise nöroenez ve gliogenezi istatistiksel olmamakla birlikte arttırmaktadır. Bmal1 *knockout* farelerde ise hem nöroenezin hem de gliogenezin azaldığı görülmüştür. Anjiyogenezi, iskemik kor bölgesi olarak nitelendirilen ve beyin hasarından birincil derece etkilenen alan ve kor bölgesinin etrafını saran penumbra bölgesinin çevresinde serebral iskemiden 4 ila 7 gün sonra ortaya çıkmaktadır. İskemi sonrası anjiyogenezi, nöronal yeniden modellenmeye ve fonksiyonel iyileşmeye katkıda bulunduğu

düşünülmektedir (Esposito vd., 2015; Hayashi vd., 2006). Ayrıca iskemi sonrasında anjiyogenezin baskılanması veya inhibe edilmesi nörogenezi baskıladığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bmal1 protein seviyesinin lentiviral vektörler aracılığıyla artırılması veya azaltılması angiogenezi (BrdU + CD31) etkilemiyorken bu proteinin genetik olarak farelerden silinmesiyle beraber angiogenez azalmaktadır.

Biyotinlenmiş dekstran aminler (BDA) sinir sisteminde rol oynayan nöronların aksonlarını takip etmek için kullanılan etkili bir yöntemdir (Reiner vd., 2000). BDA hem anterograd hem de retrograd taşınma özelliği gösterdiği için aksonal hasara sebep olan nörodejeneratif hastalık modellerinde çok sık kullanılmaktadır (Beker vd., 2020; Caglayan vd., 2019; Reiner vd., 2000). Beyin felcinin indüklenmesi nöronal hasara sebep olduğundan dolayı aksonal bağlantılara büyük bir hasar vermektedir. Projede kullandığımız 30 dk orta serebral arter tıkanması modelindebeyin hasarı 72 saat sonunda tamamlanmaktadır. Bu sürenin sonrasında ise beyin yeniden modellenmeye başlamaktadır. Yapmış olduğumuz davranış deneylerinin aksonal geçiler ile beraber bir bütün şeklinde değerlendirilebilmesi için farelerin motor kortekslerine beyin hasarından 45 gün sonra BDA enjeksiyonu yapılmıştır. BDA yüksek moleküler ağırlığa sahip olduğu için 10 gün süresince bu maddenin anterograd bir şekilde taşınması beklenmiştir. Yapılan analizler neticesinde Bmal1 *knockout* grubuna ait farelerde hem red nükleus hem de facial nükleus seviyesinde hasarsız hemisferden hasarlı hemisfere geçen akson sayısının azalmış olduğu tespit edilmiştir. Lentiviral vektörler aracılığıyla seviyesi artırılmış veya azaltılmış farelerde ise iki hemisfer arasında geçen akson sayısı bakımından bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir.

Fokal beyin felci sonrasında hasara uğrayan hücrelerin ortamdaki kaldırılmasıyla başlayan beyin yeniden modellenmesi sonrasında beyin toplam hacmi azalmaktadır. Beyin felci sonrasında iki hemisfer arasında iletişimi sağlayan korpus kallozum ve beyin fonksiyonlarının yerine getirilmesi için önemli bir bölge olan striatumda önemli miktarda atrofi olduğu bilinmektedir (Reitmeir vd., 2011; Wang vd., 2012). Bu bilgiler dahilinde beyin felci tedavilerinde bu alanlarda görülen atrofinin miktarının azaltılması önemli bir tedavi seçeneği haline gelmektedir. Glial yara iskemik beyin hasarına yanıt olarak gelişmektedir. Glial yaranın oluşumunda; astrositler reaktif astrogliozaya dönüşür ve beyin hasarının etrafını sararak hasarın daha fazla yayılmasını engeller. Bu bariyer hem fiziksel hem de kimyasal (kondroitin sülfat proteoglikanların üretimi) bariyerinin oluşumuyla sonuçlanarak beyin hasarının yayılmasını engeller (Huang vd., 2014; Zhang vd., 2018). Bmal1 protein seviyesinin artması veya azaltılması beyin felci sonrasında gelişen striatal atrofi, korpus kallozum atrofisini ve glial yara

oluşumu azaltmaktadır. Bmal1 *knockout* farelerde ise hem atrofi artmakta hem de glial yara miktrarı artmaktadır.

118S306 no'lu TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında elde edilen veriler bir bütün olarak incelendiğinde sirkadiyen ritmin belirlenmesinde ve devam ettirilmesinde önemli bir rolü bulunan Bmal1 proteini farelerde gerçekleştirilen beyin felcinin patofizyolojisinde kilit bir rol oynamaktadır. Bmal1 proteini bir sirkadiyen ritim proteini olduğu için günlük aydınlık karanlık döngüsüne bağlı olarak endojen bir şekilde artırılıp azaltılmaktadır. Lentiviral vektörler aracılığıyla farelerde Bmal1 protein seviyesinin artması veya azaltılması beyin felci patofizyolojisindeki kompleks mekanizlar üzerine direkt veya dolaylı bir şekilde etki ederek akut hasarın, apoptozun düzenlenmesinin yanı sıra beyin hasarı sonrası uzun dönemde beynin yeniden modellenmesinde önemli katkıları bulunmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışma kapsamında TÜBİTAK 1001 ARDEB programı desteği ile literatürde ilk defa lentiviral vektörler aracılığıyla protein ifadesi artırılmış veya azaltılmış Bmal1'in beyin felcindeki rolünün araştırılmasının yanı sıra Bmal1 protein anlatımının hiç olmadığı farelerde beyin felci sonrası gelişen mekanizmalar detaylı olarak araştırılmıştır. Proje verilerimizin hem beyin felci hem de sirkadiyen ritim hakkında önemli bilgiler içerdiğini ve sonraki çalışmalara yön vereceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

- Albrecht, U. 2017. "Molecular Mechanisms in Mood Regulation Involving the Circadian Clock", *Front Neurol*, 8(30).
- Astrup, J. Siesjo, B. K. Symon, L. 1981. "Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra", *Stroke*, 12(6), 723-5.
- Beker, M. Caglayan, A. B. Beker, M. C. Altunay, S. Karacay, R. Dalay, A. Altintas, M. O. Kose, G. T. Hermann, D. M. Kilic, E. 2020. "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", *Exp Neurol*, 331(113364).
- Beker, M. C. Caglayan, B. Caglayan, A. B. Kelestemur, T. Yalcin, E. Caglayan, A. Kilic, U. Baykal, A. T. Reiter, R. J. Kilic, E. 2019. "Interaction of melatonin and Bmal1 in the regulation of PI3K/AKT pathway components and cellular survival", *Sci Rep*, 9(1), 19082.
- Beker, M. C. Caglayan, B. Yalcin, E. Caglayan, A. B. Turkseven, S. Gurel, B. Kelestemur, T. Sertel, E. Sahin, Z. Kutlu, S. Kilic, U. Baykal, A. T. Kilic, E. 2017. "Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT", *Mol Neurobiol*,
- Beker, M. C. Caglayan, B. Yalcin, E. Caglayan, A. B. Turkseven, S. Gurel, B. Kelestemur, T. Sertel, E. Sahin, Z. Kutlu, S. Kilic, U. Baykal, A. T. Kilic, E. 2018. "Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT", *Mol Neurobiol*, 55(3), 2565-76.
- Boettger, M. K. Uceyler, N. Zelenka, M. Schmitt, A. Reif, A. Chen, Y. Sommer, C. 2007. "Differences in inflammatory pain in nNOS-, iNOS- and eNOS-deficient mice", *Eur J Pain*, 11(7), 810-8.
- Bouchard-Cannon, P. Mendoza-Viveros, L. Yuen, A. Kaern, M. Cheng, H. Y. 2013. "The circadian molecular clock regulates adult hippocampal neurogenesis by controlling the timing of cell-cycle entry and exit", *Cell Rep*, 5(4), 961-73.
- Broughton, B. R. Reutens, D. C. Sobey, C. G. 2009. "Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia", *Stroke*, 40(5), e331-9.
- Caglayan, A. B. Beker, M. C. Caglayan, B. Yalcin, E. Caglayan, A. Yulug, B. Hanoglu, L. Kutlu, S. Doeppner, T. R. Hermann, D. M. Kilic, E. 2019. "Acute and Post-acute Neuromodulation Induces Stroke Recovery by Promoting Survival Signaling, Neurogenesis, and Pyramidal Tract Plasticity", *Front Cell Neurosci*, 13(144).
- Camacho, A. Massieu, L. 2006. "Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death", *Arch Med Res*, 37(1), 11-8.

- Catanese, L. Tarsia, J. Fisher, M. 2017. "Acute Ischemic Stroke Therapy Overview", *Circ Res*, 120(3), 541-58.
- Chuang, H. W. Wei, I. H. Lin, F. Y. Li, C. T. Chen, K. T. Tsai, M. H. Huang, C. C. 2020. "Roles of Akt and ERK in mTOR-Dependent Antidepressant Effects of Vanillic Acid", *ACS Omega*, 5(7), 3709-16.
- Dirnagl, U. Iadecola, C. Moskowitz, M. A. 1999. "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view", *Trends Neurosci*, 22(9), 391-7.
- Duffy, J. F. Czeisler, C. A. 2009. "Effect of Light on Human Circadian Physiology", *Sleep Med Clin*, 4(2), 165-77.
- Durukan, A. Tatlisumak, T. 2007. "Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia", *Pharmacol Biochem Behav*, 87(1), 179-97.
- Esposito, E. Hayakawa, K. Maki, T. Arai, K. Lo, E. H. 2015. "Effects of Postconditioning on Neurogenesis and Angiogenesis During the Recovery Phase After Focal Cerebral Ischemia", *Stroke*, 46(9), 2691-4.
- Fisk, A. S. Tam, S. K. E. Brown, L. A. Vyazovskiy, V. V. Bannerman, D. M. Peirson, S. N. 2018. "Light and Cognition: Roles for Circadian Rhythms, Sleep, and Arousal", *Front Neurol*, 9(56).
- Gan, Y. Jing, Z. Stetler, R. A. Cao, G. 2013. "Gene delivery with viral vectors for cerebrovascular diseases", *Front Biosci (Elite Ed)*, 5(188-203).
- Gascon, S. Sobrado, M. Roda, J. M. Rodriguez-Pena, A. Diaz-Guerra, M. 2008. "Excitotoxicity and focal cerebral ischemia induce truncation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor and cleavage of the scaffolding protein PSD-95", *Mol Psychiatry*, 13(1), 99-114.
- Ginsberg, M. D. 1997. "The new language of cerebral ischemia", *AJNR Am J Neuroradiol*, 18(8), 1435-45.
- Gu, Z. Wang, B. Zhang, Y. B. Ding, H. Zhang, Y. Yu, J. Gu, M. Chan, P. Cai, Y. 2015. "Association of ARNTL and PER1 genes with Parkinson's disease: a case-control study of Han Chinese", *Sci Rep*, 5(15891).
- Hara, H. Friedlander, R. M. Gagliardini, V. Ayata, C. Fink, K. Huang, Z. Shimizu-Sasamata, M. Yuan, J. Moskowitz, M. A. 1997. "Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(5), 2007-12.
- Hayashi, T. Deguchi, K. Nagotani, S. Zhang, H. Sehara, Y. Tsuchiya, A. Abe, K. 2006. "Cerebral ischemia and angiogenesis", *Curr Neurovasc Res*, 3(2), 119-29.
- Hood, S. Amir, S. 2017. "Neurodegeneration and the Circadian Clock", *Front Aging Neurosci*, 9(170).

- Huang, L. Wu, Z. B. Zhuge, Q. Zheng, W. Shao, B. Wang, B. Sun, F. Jin, K. 2014. "Glial scar formation occurs in the human brain after ischemic stroke", *Int J Med Sci*, 11(4), 344-8.
- Jiang, W. Zhao, S. Jiang, X. Zhang, E. Hu, G. Hu, B. Zheng, P. Xiao, J. Lu, Z. Lu, Y. Ni, J. Chen, C. Wang, X. Yang, L. Wan, R. 2016. "The circadian clock gene Bmal1 acts as a potential anti-oncogene in pancreatic cancer by activating the p53 tumor suppressor pathway", *Cancer Lett*, 371(2), 314-25.
- Kilic, E. Reitmeir, R. Kilic, U. Caglayan, A. B. Beker, M. C. Kelestemur, T. Ethemoglu, M. S. Ozturk, G. Hermann, D. M. 2014. "HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Peri-Lesional Tissue Remodeling, and Contralesional Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia", *Front Cell Neurosci*, 8(422).
- Kilic, U. Caglayan, A. B. Beker, M. C. Gunal, M. Y. Caglayan, B. Yalcin, E. Kelestemur, T. Gundogdu, R. Z. Yulug, B. Yilmaz, B. Kerman, B. E. Kilic, E. 2017. "Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice", *Redox Biol*, 12(657-65).
- Klehmert, J. Harms, H. Richter, M. Prass, K. Volk, H. D. Dirnagl, U. Meisel, A. Meisel, C. 2009. "Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial", *Neuroscience*, 158(3), 1184-93.
- Ko, H. W. Kim, E. Y. Chiu, J. Vanselow, J. T. Kramer, A. Edery, I. 2010. "A hierarchical phosphorylation cascade that regulates the timing of PERIOD nuclear entry reveals novel roles for proline-directed kinases and GSK-3 β /SGG in circadian clocks", *J Neurosci*, 30(38), 12664-75.
- Kubota, K. Sakurai, T. Tamura, J. Shirakura, T. 1987. "Is the circadian change in hematocrit and blood viscosity a factor triggering cerebral and myocardial infarction?", *Stroke*, 18(4), 812-3.
- Kunimatsu, T. Kobayashi, K. Yamashita, A. Yamamoto, T. Lee, M. C. 2011. "Cerebral reactive oxygen species assessed by electron spin resonance spectroscopy in the initial stage of ischemia-reperfusion are not associated with hypothermic neuroprotection", *J Clin Neurosci*, 18(4), 545-8.
- Lacza, Z. Snipes, J. A. Zhang, J. Horvath, E. M. Figueroa, J. P. Szabo, C. Busija, D. W. 2003. "Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS", *Free Radic Biol Med*, 35(10), 1217-28.
- Lakhan, S. E. Kirchgessner, A. Hofer, M. 2009. "Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches", *J Transl Med*, 7(97).
- Lee, J. Moulik, M. Fang, Z. Saha, P. Zou, F. Xu, Y. Nelson, D. L. Ma, K. Moore, D. D. Yechoor, V. K. 2013. "Bmal1 and beta-cell clock are required for adaptation to circadian disruption, and

their loss of function leads to oxidative stress-induced beta-cell failure in mice", *Mol Cell Biol*, 33(11), 2327-38.

Li, J. Z. Bunney, B. G. Meng, F. Hagenauer, M. H. Walsh, D. M. Vawter, M. P. Evans, S. J. Choudary, P. V. Cartagena, P. Barchas, J. D. Schatzberg, A. F. Jones, E. G. Myers, R. M. Watson, S. J., Jr. Akil, H. Bunney, W. E. 2013. "Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(24), 9950-5.

Liu, H. Wei, X. Kong, L. Liu, X. Cheng, L. Yan, S. Zhang, X. Chen, L. 2015. "NOD2 is involved in the inflammatory response after cerebral ischemia-reperfusion injury and triggers NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species", *Int J Biol Sci*, 11(5), 525-35.

Malik, A. Kondratov, R. V. Jamasbi, R. J. Geusz, M. E. 2015. "Circadian Clock Genes Are Essential for Normal Adult Neurogenesis, Differentiation, and Fate Determination", *PLoS One*, 10(10), e0139655.

McBride, D. W. Tang, J. Zhang, J. H. 2016. "Development of an Infarct Volume Algorithm to Correct for Brain Swelling After Ischemic Stroke in Rats", *Acta Neurochir Suppl*, 121(103-9).

Naldini, L. Blomer, U. Gallay, P. Ory, D. Mulligan, R. Gage, F. H. Verma, I. M. Trono, D. 1996. "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector", *Science*, 272(5259), 263-7.

Namura, S. Zhu, J. Fink, K. Endres, M. Srinivasan, A. Tomaselli, K. J. Yuan, J. Moskowitz, M. A. 1998. "Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia", *J Neurosci*, 18(10), 3659-68.

Paschen, W. 1996. "Glutamate excitotoxicity in transient global cerebral ischemia", *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 56(1), 313-22.

Paul, J. R. Johnson, R. L. Jope, R. S. Gamble, K. L. 2012. "Disruption of circadian rhythmicity and suprachiasmatic action potential frequency in a mouse model with constitutive activation of glycogen synthase kinase 3", *Neuroscience*, 226(1-9).

Reiner, A. Veenman, C. L. Medina, L. Jiao, Y. Del Mar, N. Honig, M. G. 2000. "Pathway tracing using biotinylated dextran amines", *J Neurosci Methods*, 103(1), 23-37.

Reitmeir, R. Kilic, E. Kilic, U. Bacigaluppi, M. ElAli, A. Salani, G. Pluchino, S. Gassmann, M. Hermann, D. M. 2011. "Post-acute delivery of erythropoietin induces stroke recovery by promoting perilesional tissue remodelling and contralesional pyramidal tract plasticity", *Brain*, 134(Pt 1), 84-99.

Robinson, I. Reddy, A. B. 2014. "Molecular mechanisms of the circadian clockwork in mammals", *FEBS Lett*, 588(15), 2477-83.

Schallner, N. Lieberum, J. L. Gallo, D. LeBlanc, R. H., 3rd Fuller, P. M. Hanafy, K. A. Otterbein, L. E. 2017. "Carbon Monoxide Preserves Circadian Rhythm to Reduce the Severity of Subarachnoid Hemorrhage in Mice", *Stroke*, 48(9), 2565-73.

Shohami, E. Biegon, A. 2014. "Novel approach to the role of NMDA receptors in traumatic brain injury", *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 13(4), 567-73.

Spencer, S. Falcon, E. Kumar, J. Krishnan, V. Mukherjee, S. Birnbaum, S. G. McClung, C. A. 2013. "Circadian genes Period 1 and Period 2 in the nucleus accumbens regulate anxiety-related behavior", *Eur J Neurosci*, 37(2), 242-50.

Surugiu, R. Glavan, D. Popescu, M. Margaritescu, O. Eugen, R. Popa-Wagner, A. 2018. "Vasculature Remodeling in a Rat Model of Cerebral Ischemia. The Fate of the BrdU-Labeled Cells Prior to Stroke", *Front Neurol*, 9(1014).

Wang, L. E. Tittgemeyer, M. Imperati, D. Diekhoff, S. Ameli, M. Fink, G. R. Grefkes, C. 2012. "Degeneration of corpus callosum and recovery of motor function after stroke: a multimodal magnetic resonance imaging study", *Hum Brain Mapp*, 33(12), 2941-56.

Wang, Y. Ma, H. 2015. "Protein kinase profiling assays: a technology review", *Drug Discov Today Technol*, 18(1-8).

Xue, T. Song, C. Wang, Q. Wang, Y. Chen, G. 2016. "Investigations of the CLOCK and BMAL1 Proteins Binding to DNA: A Molecular Dynamics Simulation Study", *PLoS One*, 11(5), e0155105.

Yao, H. Takasawa, R. Fukuda, K. Shiokawa, D. Sadanaga-Akiyoshi, F. Ibayashi, S. Tanuma, S. Uchimura, H. 2001. "DNA fragmentation in ischemic core and penumbra in focal cerebral ischemia in rats", *Brain Res Mol Brain Res*, 91(1-2), 112-8.

Yi, J. S. Diaz, N. M. D'Souza, S. Buhr, E. D. 2021. "The molecular clockwork of mammalian cells", *Semin Cell Dev Biol*,

Yilmaz, O. Soyguder, Z. Keles, O. F. Yaman, T. Yener, Z. Uyar, A. Cakir, T. 2020. "An Immunohistochemical Study on the Presence of Nitric Oxide Synthase Isoforms (nNOS, iNOS, eNOS) in the Spinal Cord and Nodose Ganglion of Rats Receiving Ionising Gamma Radiation to their Liver", *J Vet Res*, 64(3), 445-53.

Zechariah, A. ElAli, A. Doeppner, T. R. Jin, F. Hasan, M. R. Helfrich, I. Mies, G. Hermann, D. M. 2013. "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(6), 1690-7.

Zhang, R. Wu, Y. Xie, F. Zhong, Y. Wang, Y. Xu, M. Feng, J. Charish, J. Monnier, P. P. Qin, X. 2018. "RGMa mediates reactive astrogliosis and glial scar formation through TGFbeta1/Smad2/3 signaling after stroke", *Cell Death Differ*, 25(8), 1503-16.

Zheng, X. Sehgal, A. 2010. "AKT and TOR signaling set the pace of the circadian pacemaker", Curr Biol, 20(13), 1203-8.