T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

HÜCRESEL DÜZEYDE SİRKADİYEN RİTMİN PERİYOD UZUNLUĞUNU DEĞİŞTİREN MOLEKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU

Ebru TORAMAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. İ. Halil KAVAKLI

Haziran, 2025

İSTANBUL

Bu çalışma, 18.06.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. İ. Halil KAVAKLI(II.Danışman)
Koç Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Nazmiye Özlem ŞANLI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakütesi

Doç. Dr. İbrahim BARIŞ
Koç Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu tez, yüksek lisans eğitimim boyunca öğrendiğim bilgileri bir araya getirme ve araştırma yapma fırsatı bulduğum bir çalışmanın sonucu olarak ortaya çıktı. Süreç zaman zaman yorucu ve zorlayıcı olsa da sonunda bana çok şey kattığını söyleyebilirim.

Bu çalışmada bana yol gösteren, fikirleriyle yön veren ve her zaman destek olan değerli danışmanlarım Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN ve Prof. Dr. İ. Halil KAVAKLI 'ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, laboratuvarını benimle paylaşarak araştırma yapma imkânı sunan Prof. Dr. İ. Halil KAVAKLI 'ya tekrar teşekkür etmek isterim.

Aynı zamanda bu laboratuvarda birlikte çalıştığım arkadaşlarım Seden Nadire, Elif, Merve Nur, Tuşe, Berfu Yaren, Saliha, Nursima ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma ve arkadaşlarıma emekleri ve dayanışmaları için minnettarım. Akademik anlamda ve manevi olarak her zaman yanımda olan Doç. Dr. Nazmiye Özlem ŞANLI ve tez komitemde olmayı kabul eden Doç. Dr. İbrahim BARIŞ'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Ailem ve yakın arkadaşlarım olan Ebrar ve Tuba ise bu sürecin en büyük destekçisi oldu. İyi günde kötü günde hep yanımda oldukları, sabırla ve sevgiyle beni motive ettikleri için onlara ayrı bir teşekkür borçluyum.

Lisansüstü çalışmamda TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında aldığım maddi destekten ötürü TÜBİTAK Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna teşekkür ederim. Bu değerli burs sayesinde araştırmalarıma daha verimli bir şekilde odaklanma imkânı buldum.

Tezimi tamamlarken mükemmel olmasından çok, öğrenme sürecimin bir yansıması olmasına önem verdim. Umarım bu çalışma, konuyla ilgilenenler için faydalı olur.

Haziran 2025 Ebru TORAMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **viii**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **ix**
ÖZET ..... **xi**
SUMMARY ..... **xiii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1. BİYOLOJİK SAATLERİN KÖKENİ 3
2.2. BİYOLOJİK RİTİM TÜRLERİ 3
2.3. SİRKADİYEN SAAT VE RİTİM 4
2.4. SİRKADİYEN SAATİN TEMEL PARAMETRELERİ 5
2.5. MEMELİLERDE SİRKADİYEN SAATİN ORGANİZASYONU 6
2.5.1. Hücresel Düzeyde Sirkadiyen Saat 7
2.5.2. Merkezi Saat: Suprakiazmatik Nükleus (SCN) 8
2.6. SİRKADİYEN SAATİN DÜZENLENMESİNDE POST-TRANSLASYONEL MODİFİKASYONLAR 10
2.7. ÇEKİRDEK SAAT PROTEİNLERİNİN YAPISI 11
2.8. SİRKADİYEN SAAT VE HASTALIK İLE İLİŞKİSİ 13
2.9. SİRKADİYEN SAATİ MODÜLE ETME POTANSİYELİNE SAHİP KÜÇÜK MOLEKÜLLER 14
3. MALZEME VE YÖNTEM **16**
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ 16
3.2. SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ (MTT TESTİ) 16
3.3. PROTEİN YIKIM (DEGRADASYON) ANALİZİ 17
3.4. SİRKADİYEN SALINIMLARIN GERÇEK ZAMANLI TAKİBİ 18
3.5. SDS-PAGE VE WESTERN BLOT ANALİZİ 18
3.6. TOTAL RNA İZOLASYONU VE RT-QPCR ANALİZİ 20
3.7. HÜCRE İÇİ FRAKSİYONLAMA VE WESTERN BLOT ANALİZİ 22

3.8. KO-İMMUNOPRESİPİTASYON (CO-IP) ANALİZİ 23
3.9. İSTATİKSEL ANALİZ 24
4. BULGULAR 25
4.1. KÜÇÜK MOLEKÜLLERİN YAPI TABANLI İLAÇ TASARIMI YÖNTEMİYLE *İN SİLİKO* TARAMA SÜRECİ 25
4.2. SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ (MTT TESTİ) SONUÇLARI 25
4.3. PROTEİN YIKIM (DEGRADASYON) ANALİZİ SONUÇLARI 27
4.4. SİRKADİYEN SALINIMLARIN GERÇEK ZAMANLI TAKİBİ 28
4.5. E9 MOLEKÜLÜ UYGULAMASININ SİRKADİYEN SAATİN ÇEKİRDEK PROTEİN BİLEŞENLERİ DÜZEYLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ 29
4.6. E9 MOLEKÜLÜ UYGULAMASININ ÇEKİRDEK SAAT GENLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNE ETKİSİ 31
4.7. E9 MOLEKÜLÜNÜN ÇEKİRDEK SAAT PROTEİNLERİNİN HÜCRE ALTI LOKALİZASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ 33
4.8. E9 MOLEKÜLÜ VARLIĞINDA KO-İMMUNOPRESİPİTASYON (CO-IP) 35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 37
KAYNAKLAR 40
ÖZGEÇMİŞ 52

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Sirkadiyen ritmin parametleri: faz, periyot, genlik, ZT ve CT (Schmitt vd., 2016'dan değiştirilerek).....6

Şekil 2.2: Üç temel geri bildirim döngüsünden oluşan sirkadiyen saatin moleküler yapısı (Salazar & von Hagen, 2023'ten değiştirilerek).....10

Şekil 2.3: Beyindeki içsel sirkadiyen salınımlar (SCN) ve dış zeitgeberler (ipuçları) **(**Buttgereit vd., 2015'ten değiştirilerek).....10

Şekil 2.4: CLOCK:BMAL1 heterodimer yapısı, bHLH, PAS-A ve PAS-B bölgelerini içermektedir. Bağlayıcı (linker) bölgeler kırmızı veya turuncu renkte gösterilmiştir-(N. Huang vd., 2012).....13

Şekil 4.1: E9'un kimyasal yapısı. 1-Phenyl-4-(4-{2-phenyl-1H,4H,5H,6H,7H,8H-cyclohepta[B]pyrrol-1-YL}benzoyl)piperazine.....25

Şekil 4.2: E9'un U2OS *Bmal1-dLuc* hücre hattı üzerindeki toksisite çalışması.....26

Şekil 4.3: E9 molekülünün lüsiferazın yarı ömrüne etkisinin değerlendirilmesi.....27

Şekil 4.4: E9 molekülünün 5 μM ile 20 μM arasındaki konsantrasyonlarının U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde sirkadiyen periyot uzunluğuna etkisinin biyolüminesans yöntemiyle değerlendirilmesi. A) Kontrol grubu: %0.4 DMSO uygulanmış U2OS Bmal1-dLuc hücreleri, B) E9 molekülünün U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde genliğe etkisi C) E9 molekülünün U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde sirkadiyen saat periyoduna etkisi. D) E9 molekülünün U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde sirkadiyen saat fazına etkisi. 28

Şekil 4.5: E9 molekülünün (20 μM) senkronize olmayan U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde temel saat proteinleri üzerindeki etkisinin Western blot yöntemiyle değerlendirme sonuçları. A) Western blot analizine ait görseller (ChemiDoc Touch Imaging System, BioRad), B) E9 molekülünün PER2, CLOCK, BMAL1 ve CRY1 endojen protein düzeylerine etkisi.....30

Şekil 4.6: E9 molekülü uygulamasının çekirdek saat genlerinin ifade düzeylerine etkisinin değerlendirilmesi. 32

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: RT-qPCR analizi için kullanılan ileri (forward) ve ters (reverse) primer dizileri. 22

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

% : Yüzde
β : Beta
Δ : Delta
µ : Mikro

Kısaltmalar **Açıklama**

bHLH : Basic Helix-Loop-Helix
BMAL1/ ARNTL1 : Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
CCGs : Saat Kontrollü Genler
CHX : Sikloheksimid
CKIε/Iδ : kazein kinaz 1 epsilon/1 sigma
CLOCK : Circadian Locomotor Output Cycles Caput
Co-IP : Ko-İmmünopresipitasyon
CRY : Cryptochrome
CT : Sirkadiyen Time
DBP : Albümin promotörünün (albümin D-box) bağlayıcı proteininin D bölgesi
DNA : Deoksiribonükleik Asit
DSWPD : Familial Delayed Sleep-Wake Phase Disorder
FASPS : Familial Advanced Sleep Phase Syndrome
FBXL3/21 : F-box/LRR-repeat protein 3/21
GSK-3β : Glikogen sentaz kinaz 3 beta
HEK 293T : İnsan Embriyonik Böbrek Hücreleri
LUC : Lüsiferaz
NEAA : Esansiyel Olmayan Amino Asitler
NES : Nükleer Export Sinyali
NLS : Nükleer Lokalizasyon Sinyali
PAS : Per-Arnt-Single-minded
PER : Periyod

PHR : Fotoliyaz Homolog Bölgesi

PTM : Post-translasyonel Modifikasyonlar

REV-ERB : Nuclear receptor subfamily 1, group D RHT: Retinohypothalamic Tract

ROR : RAR-related orphan receptor

RORE : RAR-related orphan receptor response element

SCN : Suprakiazmatik Nükleus

TTFL : Transkripsiyonel-Translasyonel Geri Bildirim Döngüsü

U2OS : İnsan kemik osteosarkomu epitel hücreleri

ZT : Zeitgeber Time

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HÜCRESEL DÜZEYDE SİRKADİYEN RİTMİN PERİYOD UZUNLUĞUNU DEĞİŞTİREN MOLEKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU

Ebru TORAMAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN

II. Danışman : Prof. Dr. İ. Halil KAVAKLI

Canlıların davranışsal ve fizyolojik özelliklerinde gözlemlenen günlük ritmik değişimler, çevresel ışık-karanlık döngüsüne uyum sağlamak amacıyla ortaya çıkar ve bu değişimlerin temelinde yaklaşık 24 saatlik bir biyolojik saat mekanizması bulunur. Memelilerde bu saat, birbirini düzenleyen transkripsiyonel ve translasyonel geri besleme döngüleri (TTFL'ler) ile yönetilen hiyerarşik bir sistem şeklindedir. Moleküler düzeyde, CLOCK ve BMAL1 proteinleri bir araya gelerek E-box dizilerini tanır ve saatle ilişkili genlerin (CRY ve PER dahil) transkripsiyonunu başlatır. Sitoplazmada biriken CRY ve PER proteinleri, Casein Kinase Iε ile birlikte çekirdeğe taşınarak CLOCK:BMAL1 kompleksinin transkripsiyonel aktivitesini baskılar.

Bu temel saat proteinlerinin aktivitelerini modüle edebilen küçük moleküller, sirkadiyen ritmin zamanlamasını dışarıdan kontrol etme potansiyeli taşır. Sirkadiyen ritmin bozulması durumunda ortaya çıkabilecek kanser, metabolik hastalıklar ve yaşlanma gibi çeşitli sağlık

sorunları dikkate alındığında, bu tür moleküllerin tanımlanması oldukça önemlidir. Bu doğrultuda, İ. Halil KAVAKLI ve ekibi tarafından daha önce keşfedilen E9 adlı küçük molekülü, CLOCK proteinine bağlanan yeni bir bileşik olarak ayrıntılı biçimde inceledim. E9, hücreye zarar vermeden sirkadiyen periyodu uzatmış; CLOCK ve BMAL1 protein düzeylerini azaltmış ve bu proteinlerin çekirdeğe taşınmasını engellemiştir. Ayrıca CLOCK-BMAL1 etkileşimi zayıflamıştır. Bu sonuçlar, E9'un sirkadiyen saat mekanizmasını doğrudan etkileyebildiğini ortaya koymakta ve onu sirkadiyen ritim bozukluklarına bağlı metabolik hastalıklar, uyku bozuklukları ve kanser gibi durumlar için potansiyel bir terapötik aday haline getirmektedir.

Haziran 2025, 66 sayfa.

Anahtar kelimeler: Sirkadiyen saat, küçük molekül, CLOCK, ilaç geliştirme

SUMMARY

M.Sc. THESIS

CHARACTERIZATION OF MOLECULES THAT ALTERS CIRCADIAN RHYTHM PERIOD LENGHT AT CELLULAR LEVEL

Ebru TORAMAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN

Co-Supervisor : Prof. Dr. İ. Halil KAVAKLI

The daily rhythmic changes observed in the behavioural and physiological characteristics of living organisms occur to enable them to adapt to the light-dark cycle of their environment. These changes are based on a biological clock mechanism that operates over a period of approximately 24 hours. In mammals, this clock operates as a hierarchical system, which is governed by mutually regulating transcriptional and translational feedback loops (TTFLs). At the molecular level, CLOCK and BMAL1 proteins bind to recognise E-box sequences, initiating the transcription of clock-related genes, including CRY and PER. The CRY and PER proteins, which accumulate in the cytoplasm, are transported to the nucleus with Casein Kinase Iε, where they repress the transcriptional activity of the CLOCK:BMAL1 complex.

Small molecules that can modulate the activities of these basic clock proteins have the potential to externally control the timing of the circadian rhythm. Considering the various health

problems such as cancer, metabolic diseases and aging that may arise in case of disruption of circadian rhythm, it is very important to identify such molecules. In this direction, I have analysed in detail the small molecule E9, previously discovered by İ. Halil KAVAKLI and colleagues, as a new compound that binds to CLOCK protein. E9 prolonged the circadian period without damaging the cell; decreased CLOCK and BMAL1 protein levels and prevented the transport of these proteins to the nucleus. In addition, the CLOCK-BMAL1 interaction was attenuated. These results demonstrate that E9 can directly affect the circadian clock mechanism and make it a potential therapeutic candidate for conditions such as metabolic diseases, sleep disorders and cancer related to circadian rhythm disorders.

June 2025, 66 pages.

Keywords: Circadian clock, small molecule, CLOCK, drug development

1. GİRİŞ

Sirkadiyen saat, organizmaların ışık, sıcaklık ve diğer çevresel faktörlerin günlük dış ritimlerine uyum sağlamasını sağlayan otonom ve endojen bir zamanlayıcıdır ve günümüz organizmalarının sirkadiyen saatleri 24 saate yakın periyotlarla salınır (Wijnen & Young, 2006). "Sirkadiyen" (Latince circa diem, yani 'güne yakın') saatin senkronizasyonu, organizmanın çevredeki düzenli değişimleri önceden tahmin etmesini sağlayarak; besin alımı ve metabolizma, av/avcı etkileşimleri, çevresel etkenlerin yol açtığı DNA hasarından korunma ve hayatta kalma şansını etkileyen moleküler ve davranışsal olayları şekillendirir (Partch vd., 2014).

Memelilerdeki sirkadiyen saat hem yukarıdan-aşağıya (top-down) hem de aşağıdan-yukarıya (bottom-up) bir organizasyona sahiptir. Günlük ritimleri üretme yetisi, hücresel bir özelliktir. Bu hücresel saat, dokular, organlar ve tüm organizma düzeyinde sirkadiyen programı oluşturan bir ağ meydana getirir. Memelilerdeki yukarıdan-aşağıya organizasyonun merkezi, optik kiyazmanın (görsel sinirlerin çaprazlaştığı nokta) üzerinde yer alan bir çekirdeğe, yani suprakiazmatik nükleus (SCN) bölgesine dayanır. Bu ana zamanlayıcı, retina aracılığıyla fotik (ışığa ait) bilgiyi alır, kendi nöronal hücresel saatlerini senkronize eder ve vücuttaki diğer organ ve dokularda bulunan çevresel (periferik) saatlere ileterek onların da senkronize olmasını sağlar (Roenneberg & Merrow, 2016).

Temel olarak, memeli sirkadiyen saati, yaklaşık 24 saatlik bir periyotla gen ifadesinde kendi kendini sürdüren bir ritim üreten, otoregülatör transkripsiyon ve translasyon geri bildirim döngüsü (TTFL) oluşturan moleküler bir genetik ağdır. TTFL, heterodimerik transkripsiyonel aktivatörler CLOCK ve BMAL1 ile bunların baskılayıcıları PER1, PER2, CRY1 ve CRY2 proteinlerinden oluşur (Laothamatas vd., 2023). CLOCK ve BMAL1, temel helix-loop-helix (bHLH)-PAS alanları aracılığıyla bir heterodimer oluşturur ve Kriptokrom (Cry) ve Periyot (Per) gibi saat kontrollü genlerin (CCG'ler) promotörlerindeki E-Kutu dizilerine bağlanır ve transkripsiyonlarını başlatır (Kavakli vd., 2022). CRY ve PER proteinleri sitozolde biriktikçe, bir heterodimer oluştururlar ve Casein Kinase I epsilon/delta (CKI ε/δ) ile çekirdeğe taşınırlar. Burada, BMAL1/CLOCK kompleksinin aktivitesini baskılarlar ve dolayısıyla saat kontrollü genlerin (CCG'lerin) ifadesini engellerler. CKI'ler tarafından gerçekleştirilen fosforilasyon ya

da çekirdek saat proteinlerinin ubikitinasyon gibi post-translasyonel modifikasyonları, bu baskılayıcı döngünün sona ermesini sağlar ve böylece sirkadiyen ritmin yeniden başlamasına yol açar (Von Schantz & Archer, 2003). 2014 yılında yayımlanan bir çalışma, farelerde protein kodlayan genlerin %43'ünün en az bir dokuda sirkadiyen kontrol altında olduğunu göstermektedir (R. Zhang vd., 2014). Bu bulgu sirkadiyen saatin memelilerde fizyolojik süreçler üzerindeki yaygın ve derin etkisini göstermekte; dolayısıyla, sirkadiyen sistemin düzgün işleyişinin ne denli önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte sirkadiyen saatin bozulması, sistemik homeostazide bir çöküşe yol açabilir ve kanser, depresyon, metabolik sendrom ve kardiyovasküler hastalık dahil olmak üzere olumsuz sağlık sonuçlarına neden olabilir (Ohdo vd., 2019).

Son zamanlarda araştırmacılar, kötü huylu tümörler de dahil olmak üzere saatle ilişkili hastalıkları tedavi etmek için sirkadiyen saati düzenleyebilen birkaç küçük molekül keşfettiler (Rahman vd., 2020). Örnek olarak CLOCK veya CRY gibi çekirdek saat proteinlerine bağlanan bazı küçük moleküller keşfedilmiştir. Halil Kavaklı ve ekibi, *in silico* yaklaşımını kullanarak CLOCK'a bağlanan CLK8 adlı küçük bir molekül tanımlamıştır. Daha ileri deneysel çalışmalar, CLK8'in CLOCK ve BMAL1 arasındaki etkileşimi azalttığını ve buna karşılık sirkadiyen ritim genliğini artırdığını ortaya koymuştur (Doruk vd., 2020). Ancak sadece CLOCK üzerinde etki gösteren ilaç adayı küçük moleküllerin karakterizasyonunda bir boşluk bulunmaktadır. Bu doğrultuda, daha önce Halil Kavaklı ve ekibi tarafından gerçekleştirilen *in silico* taramalar sonucunda belirlenen CLOCK proteinine bağlanan E9 adlı molekül ile çalışmalarıma başladım ve karakterizasyon sürecini bu molekül üzerinde yoğunlaştırdım. Biyolüminesans analizleri, E9'un hücreye zarar vermeden sirkadiyen periyodu uzattığını göstermiştir. Protein ve gen analizleri, CLOCK ve BMAL1 seviyelerinde azalma, bazı saat genlerinin mRNA düzeylerinde ise artış olduğunu ortaya koymuştur. Lokalizasyon ve etkileşim deneyleri, E9'un CLOCK'un çekirdeğe girişini ve BMAL1 ile etkileşimini azalttığını doğrulamıştır. Bu da, E9'un sirkadiyen saat mekanizmasını doğrudan etkilediğini göstermektedir. Ancak bu etkinin tam mekanizması henüz net değildir ve ileri analizlerle açıklığa kavuşturulmalıdır. Bu çalışma, CLOCK'u hedef alan yeni moleküllerin geliştirilmesine yönelik önemli bir başlangıçtır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1.BİYOLOJİK SAATLERİN KÖKENİ

Dünya'nın kendi ekseni etrafında yaklaşık her 24 saatte bir dönmesinin bir sonucu olarak, bu gezegendeki çoğu organizma, ışık ve sıcaklıktaki öngörülebilir dalgalanmalara maruz kalmaktadır. Siyanobakterilerden insanlara kadar çok çeşitli türler, bu günlük değişimlere önceden uyum sağlayabilmek amacıyla evrimsel süreçte içsel biyolojik saatler geliştirmiştir (Jabbur & Johnson, 2022). Bu nedenle, iç fizyolojimiz ve işlevlerimiz, bu jeofiziksel döngüyle temel düzeyde iç içe geçmiştir. Nitekim, iç fizyoloji ile jeofiziksel döngü arasındaki bu evrimsel ilişkiye dair bulgular ilk olarak Jean-Jacques d'Ortous de Mairan (1678-1771) tarafından ortaya konmuştur (Kuhlman vd., 2018). de Mairan (1729), bir heliotrop bitkisinde (muhtemelen *Mimosa pudica*) yaprakların açılıp kapanma şeklinde sergilediği sirkadiyen ritmi, tamamen karanlık koşullarda gözlemlemiştir ve bu hareketlerin, bitkinin içsel ritmiyle ilişkili olduğunu öne sürmüştür (Srivastava vd., 2019). Ritimlerin tamamen karanlık bir ortamda da sürmesi, bu hareketlerin dış etkenlerden bağımsız olarak çalışan, yani organizmanın içinde bulunan bir biyolojik saat tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Bu, saatin kendi kendine devam eden bir mekanizmaya sahip olduğunu, başka bir deyişle dış uyaranlar olmadan da işlediğini ifade eder. Ancak bir saatin işlevsel olabilmesi için aynı zamanda kendini yeniden ayarlayabilmesi gerekir. Bu nedenle, organizmalardaki sirkadiyen ritimlerin mevsimsel olarak değişen gün ışığı döngülerine uyum sağlayabilmesi önemlidir. Bu uyum, çevresel işaretlerle sağlanır; biyolojik saat, bu sinyaller aracılığıyla doğru zamana göre kendini senkronize eder. Memelilerde bu senkronizasyonu sağlayan en etkili çevresel etkenler ise ışık ve besin alımıdır (Roenneberg & Merrow, 2005; Wulund & Reddy, 2015). Bu bulgular doğrultusunda da devam eden yıllarda, çok çeşitli canlı türlerinde ve farklı hücre tiplerinde intrinsik (içsel) sirkadiyen ritimlerin varlığı kanıtlanmış, böylece biyolojik saatin evrenselliği ve temel fizyolojik süreçlerdeki rolü daha da netlik kazanmıştır.

2.2. BİYOLOJİK RİTİM TÜRLERİ

Tüm biyolojik ritimler zaman içinde kendiliğinden düzenlenen süreçleri yansıtsa da bazıları doğrudan zamanın geçişini izlemek amacıyla işlemez. Örneğin, kalp ritmi kalbin düzenli atmasını mümkün kılarken, sinirsel yapılar, yürüyüş ve solunum gibi ritmik davranışları kontrol eder (Goldbeter, 2008). Buna karşılık, birçok biyolojik ritim zamanın izlenmesiyle doğrudan

ilişkilidir. Sirkadiyen saat ve yıllık ritimler, dünyanın döngüsel doğasına uyum sağlama işlevi görür (Raible vd., 2017). Örneğin, 24 saatlik ritimler organizmaların gece-gündüz döngüsünü önceden tahmin ederek uyum sağlamasına yardımcı olurken, yıllık ritimler mevsimsel değişimlere adaptasyonu destekler (Fuyi, 2024; Helm & Lincoln, 2017). Bu yönleriyle, sirkadiyen saat ve mevsimsel ritimler, biyolojik düzenlilik ile zaman kavramı arasında en ilişkili mekanizmalardır.

2.3. SİRKADİYEN SAAT VE RİTİM

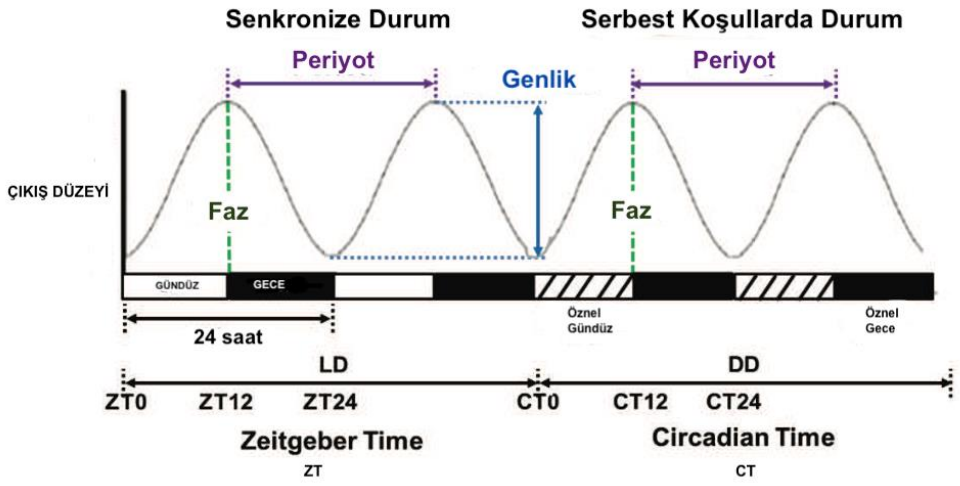
Sirkadiyen ritim kavramı, Halberg tarafından organizmalarda gözlemlenen ve Dünya'nın günlük dönüş hareketiyle uyumlu olarak yaklaşık 24 saatlik döngüler halinde gerçekleşen içsel biyolojik salınımları tanımlamak üzere ortaya konmuştur (Fagiani vd., 2022). Latince "circa diem" yani "güne yakın" anlamında türetilmiştir (Dibner vd., 2009). Bu ritimler, uyku-uyanıklık döngüsünden vücut ısısına, hormon salınımından metabolik aktivitelere kadar pek çok fizyolojik ve davranışsal süreci düzenler. Bu ritimlerin temelinde ise organizma içinde yer alan sirkadiyen saat bulunur (Meléndez-Fernández vd., 2023; Takahashi, 2017). Bu ritimlerin mekanizması, genellikle birbirini düzenleyen gen ve proteinlerin oluşturduğu geri besleme döngüleriyle işler ve prokaryotlardan ökaryotlara kadar birçok organizmada sirkadiyen ritimlerin işleyişi moleküler mekanizmalar açısından çeşitlilik gösterir ancak temel prensipler genellikle benzerdir. İlk olarak uzun süre boyunca bakterilerin sirkadiyen ritimlere sahip olmadığı düşünülse de ilk kanıt, nitrojen sabitleyici bir siyanobakteri olan *Synechococcus* RF1'i inceleyen bir araştırmadan gelmiştir (Grobbelaar vd., 1986; Johnson vd., 2011). Bu siyanobakteride, nitrojen sabitlenmesi sirkadiyen saat tarafından düzenlenmektedir, böylece gece fazında maksimum olmaktadır (T.-C. Huang & Chou, 1991). Siyanobakterilerde sirkadiyen saat, KaiA, KaiB ve KaiC proteinlerinin oluşturduğu bir geri besleme döngüsüyle çalışır. Bu proteinler, ATP'nin hidroliziyle fosforilasyon ve defosforilasyon süreçlerini düzenleyerek 24 saatlik ritmik bir aktivite oluşturur (Johnson vd., 2008). Bu mekanizma, transkripsiyon ve translasyon süreçlerinden bağımsız olarak *in vitro* ortamda da çalışabilmektedir (Williams, 2006). Bitkilerde ise sirkadiyen saat, çevresel sinyallere (ışık, sıcaklık gibi) duyarlı olan ve genetik olarak kodlanmış bir dizi geri besleme döngüsüyle işler (Inoue vd., 2017). *Arabidopsis thaliana* gibi model bitkilerde, CCA1, LHY ve TOC1 genleri bu döngünün temel bileşenleridir (Z. Ding vd., 2007; Schaffer vd., 1998; Strayer vd., 2000; Wang & Tobin, 1998). Bu genler, birbirlerinin ekspresyonunu düzenleyerek günün farklı

zamanlarında belirli genlerin aktif olmasını sağlar. Bu mekanizma, fotosentez, çiçeklenme zamanı ve yaprak hareketleri gibi önemli fizyolojik süreçleri senkronize eder (Lopez vd., 2021). Filamentli mantar türü olan *Neurospora crassa* ise fungalarda sirkadiyen ritimlerin incelenmesinde model organizma olarak kullanılmıştır (Merrow vd., 2001). Bu organizmada, WC-1 ve WC-2 proteinleri, FRQ geninin transkripsiyonunu düzenler (Crosthwaite vd., 1997; Loros & Dunlap, 2025). FRQ proteini, WC kompleksinin aktivitesini inhibe ederek negatif bir geri besleme döngüsü oluşturur. Bu mekanizma, ışık ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerle senkronize olur ve organizmanın fizyolojik süreçlerini düzenler (Cha vd., 2011; Diernfellner vd., 2007). Hayvanlar açısından incelenecek olursa sirkadiyen ritimlerin en iyi karakterize edildiği sistemlerden biri memelilerdir. Memelilerde merkezi saat, hipotalamusta yer alan suprakiazmatik nükleus (SCN) içinde bulunur ve çevresel ipuçları (zeitgeber) olan, ışık sinyalleri veya sıcaklık gibi ipuçları ile senkronize olur (Astiz vd., 2019). Ancak SCN dışında da kalp, karaciğer, böbrek gibi periferik dokularda çalışan lokal saat mekanizmaları vardır (Hunter & Bechtold, 2025). Bu saatlerin işleyişinde, CLOCK ve BMAL1 transkripsiyon faktörleri kritik rol oynar; bu proteinler, PER ve CRY genlerinin ifadesini tetikleyerek negatif geri besleme döngüsü oluşturur. Bu döngü, 24 saatlik ritmik bir aktivite ile organizmanın fizyolojik süreçlerini düzenler (Yu vd., 2002).

2.4. SİRKADİYEN SAATİN TEMEL PARAMETRELERİ

Sirkadiyen ritimlerin işleyişi, sadece belirli genlerin ifade edilmesiyle sınırlı değildir; bu ritimlerin nasıl çalıştığını anlamak için genlik, faz gibi kavramların da açıklanması gerekmektedir. Bu kavramlar, biyolojik saatlerin ve ritimlerin nasıl organize olduğunu, çevresel faktörlerle nasıl senkronize olduklarını ve organizmanın fizyolojik süreçlerini nasıl düzenlediklerini daha iyi anlamamıza yardımcı olur. İlk olarak sirkadiyen ritimlerin genliği, bu ritmin ne kadar belirgin veya güçlü olduğunu ifade eder (Refinetti, 2000). Yani, ritmin ne kadar fazla değişim gösterdiği, bir biyolojik parametrenin (örneğin, vücut sıcaklığı, hormon seviyesi) 24 saatlik döngüde ne kadar yüksek veya düşük değerler aldığı, genlik kavramı ile ilişkilidir (Reid, 2019; T. Zhang vd., 2023). Faz ise sirkadiyen ritmin belirli bir olayının (örneğin, maksimum aktivite) meydana geldiği zaman dilimini belirtir. Faz kaymaları, çevresel faktörlerin (örneğin, ışık) etkisiyle ritmin zamanlamasında meydana gelen değişiklikleri ifade eder (Masuda vd., 2023). Periyot da ritmin tekrarlayan döngüsünün süresini belirtir. Normalde, bir sirkadiyen ritmin periyodu yaklaşık olarak 24 saattir, ancak çeşitli genetik ve çevresel

faktörler, bu döngünün süresini uzatabilir veya kısaltabilir (Kavakli, 2002). Bununla beraber sirkadiyen ritimlerin aktivitesinin değiştirilebilmesi için periyotların 24 saate yakın bir süreye ayarlanması gerekmektedir. Bu ayarlama, ritmin organizmanın biyolojik ihtiyaçlarıyla uyumlu olmasını sağlar (Minors & Waterhouse, 2013). Örneğin, bazı organizmaların biyolojik saatlerinin doğal periyotları, 24 saatten biraz daha kısa veya uzun olabilir, ancak zamanlayıcılar veya çevresel ipuçları (zeitgeber) periyot ve faz sürekliliğini koruyarak, biyolojik saatin dış çevreyle uyumlu olmasını sağlar (V. K. Sharma & Chandrashekaran, 2005). Son olarak zaman kavramı için en sık kullanılan iki terim Zeitgeber Time (ZT) ve Circadian Time (CT)'dir (Vatakis vd., 2018). ZT, ışık gibi çevresel ipuçlarına dayalıdır; örneğin, 12 saat ışık / 12 saat karanlık döngüsünde ışığın açıldığı an ZT0, karanlığın başladığı an ise ZT12 olarak tanımlanır (Eckel-Mahan & Sassone-Corsi, 2015). Buna karşılık CT, organizmanın yalnızca içsel saatine göre tanımlanır ve sabit karanlıkta ölçülür. Bu durumda, aktivite başlangıcı genellikle CT12 kabul edilir (Kao, 2016). Her iki terim birlikte değerlendirildiğinde, sirkadiyen sistemin çevresel uyaranlara adaptasyonu ve içsel zamanlamasını daha iyi anlamamıza yarar.



Şekil 2.1: Sirkadiyen ritmin parametleri: faz, periyot, genlik, ZT ve CT (Schmitt vd., 2016'dan değiştirilerek).

2.5. MEMELİLERDE SİRKADİYEN SAATİN ORGANİZASYONU

Memelilerde sirkadiyen ritimlerin organizasyonu, çok katmanlı bir hiyerarşik yapıya sahiptir (Honma, 2018). Bu yapı, hem hücresel düzeyde otonom çalışan saat mekanizmalarını hem de bu saatlerin organizma genelinde koordineli bir şekilde senkronize edilmesini sağlayan merkezi yapılardan oluşur (Chaix vd., 2016). Sirkadiyen saat sistemi, sadece tek bir merkezi saatten ibaret olmayıp, her hücrede bağımsız olarak çalışan saat genlerinin bir ağı şeklinde

düzenlenmiştir (Honma, 2018). Bu ağ, hem yukarıdan aşağıya (top-down) hem de aşağıdan yukarıya (bottom-up) sinyallerle organize edilir (Roenneberg & Merrow, 2016).

2.5.1. Hücresel Düzeyde Sirkadiyen Saat

Memelilerde sirkadiyen saat sistemi, hücrenin çekirdeğinde yer alan ve yaklaşık 24 saatlik ritmik gen ekspresyonu üretebilen otonom bir moleküler bir düzenekle karakterize edilir (Laothamatas vd., 2023). Bu moleküler saat, hücre düzeyinde çalışan ve çevresel ipuçları olmadan da kendi kendine sürdürülebilen birincil ve ikincil olmak üzere birbirine kenetli transkripsiyon-translasyon geri besleme döngülerine (TTFL'lere) dayanır (Partch, 2020). Bu döngü hem ritmin devamlılığını sağlar hem de çevresel değişimlere yanıt verebilme kapasitesi sunar (Roenneberg & Foster, 1997).

Birincil TTFL, pozitif kolda CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) ve BMAL1 (Brain and Muscle ARNT-Like 1) proteinlerinden oluşan heterodimerik transkripsiyon faktörü kompleksinin oluşmaşı ile başlar (C. Lee vd., 2001; Tischkau, 2020). CLOCK:BMAL1 kompleksi, saatle kontrol edilen genlerin (CCG'ler) yani *Period (Per1, Per2, Per3), Kriptokrom (Cry1 ve Cry2)'un* ritmik transkripsiyonunu aktive etmek için DNA'ya ritmik olarak bağlanır (Trott & Menet, 2018). Bu genler promotör bölgelerinde bulunan E-Box (CACGTG) kutucuğunun kontrolü altında transkripsiyona uğrarlar ve bununla beraber BMAL1 ve CLOCK proteinleri de bazik helix-loop-helix (bHLH) ve PER-ARNT-SIM (PAS) alanlarına sahiptir (Couchie vd., 2022; Hirayama & Sassone-Corsi, 2005; Nakahata vd., 2008). İfade edilen PER ve CRY proteinleri sitoplazmada birikerek kompleks oluşturur, ardından kazein kinaz 1ε/δ (CK1ε/δ) ile etkileşime girerek çekirdeğe taşınır (Keshvari vd., 2020; Z. Zhang vd., 2020). Bu kompleks, CLOCK:BMAL1 aktivitesini baskılayarak döngünün negatif kolunu oluşturur (Yao vd., 2021). Daha sonra PER:CRY kompleksi, E3 ubikutin ligazları tarafından ubikine edilerek proteazomal yıkıma uğrar ve döngü yeniden başlar (Merbitz-Zahradnik & Wolf, 2015; Srikanta & Cermakian, 2021).

İkincil TTFL, saat sisteminin pozitif kolunda yer alan BMAL1 proteininin genetik düzeyde regülasyonuna odaklanmaktadır (de Assis & Oster, 2021). BMAL1 gen ekspresyonu, iki zıt işlevli çekirdek reseptörü olan REV-ERBα/β (NR1D1/2) ve RORα/β/γ (retinoik asit reseptörüne benzer orphan reseptörler) aracılığıyla kontrol edilir (Kim vd., 2022). REV-ERBα transkripsiyonu BMAL1/CLOCK heterodimeri tarafından aktive edilir ve CRY/PER tarafından

transreprese edilir, bu da REV-ERBα'nın sirkadiyen salınımlarıyla sonuçlanır. REV-ERBα, sırayla BMAL1 ve CLOCK transkripsiyonunu baskılar. REV-ERBβ ifadesi de sirkadiyen bir şekilde salınır ve BMAL1 transkripsiyonunu baskılayabilir. RORα, BMAL1 promotöründe paylaştıkları DNA bağlanma elemanları olan RORE'nin bağlanması için REV-ERBα ile rekabet eder ve bu da BMAL1 ifadesinin REVERBα tarafından baskılanmasına ve RORα tarafından aktive edilmesine yol açar. Bu REV-ERBα/RORα geri bildirim döngüsü çekirdek sirkadiyen saatin pozitif ve negatif uzuvlarını birbirine bağlar (Sato vd., 2004; Solt vd., 2011).

Üçüncü TTFL, BMAL1/CLOCK kompleksinin PAR-bZip (prolin ve asidik amino asit açısından zengin basic leucine zipper) ailesine ait transkripsiyon faktörü olan DBP (Albumin D-site Binding Protein) geninin ekspresyonunu indüklemesiyle oluşur. DBP, gen promotörlerinde bulunan D-box düzenleyici bölgelerine bağlanarak görev yapar. Bu bölgelerde aynı zamanda DBP'nin etkisini dengeleyen bir baskılayıcı olan NFIL3 (Nuclear Factor, Interleukin-3 Regulated; E4BP4 olarak da bilinir) ile etkileşim içindedir. NFIL3'ün ekspresyonu ise REV-ERB/ROR döngüsü tarafından düzenlenmektedir. D-box elementleri, başta PER genleri olmak üzere birçok saat geni promotör bölgesinde yer almaktadır (de Assis & Oster, 2021).

Sonuç olarak, bu üç iç içe geçmiş TTFL yapısı sayesinde, sirkadiyen ritimler yalnızca temel saat genlerinin ekspresyonuyla değil, aynı zamanda farklı fazlarda ifade edilen düzenleyici proteinler aracılığıyla çok katmanlı ve dinamik bir şekilde kontrol altında tutulur.

2.5.2. Merkezi Saat: Suprakiazmatik Nükleus (SCN)

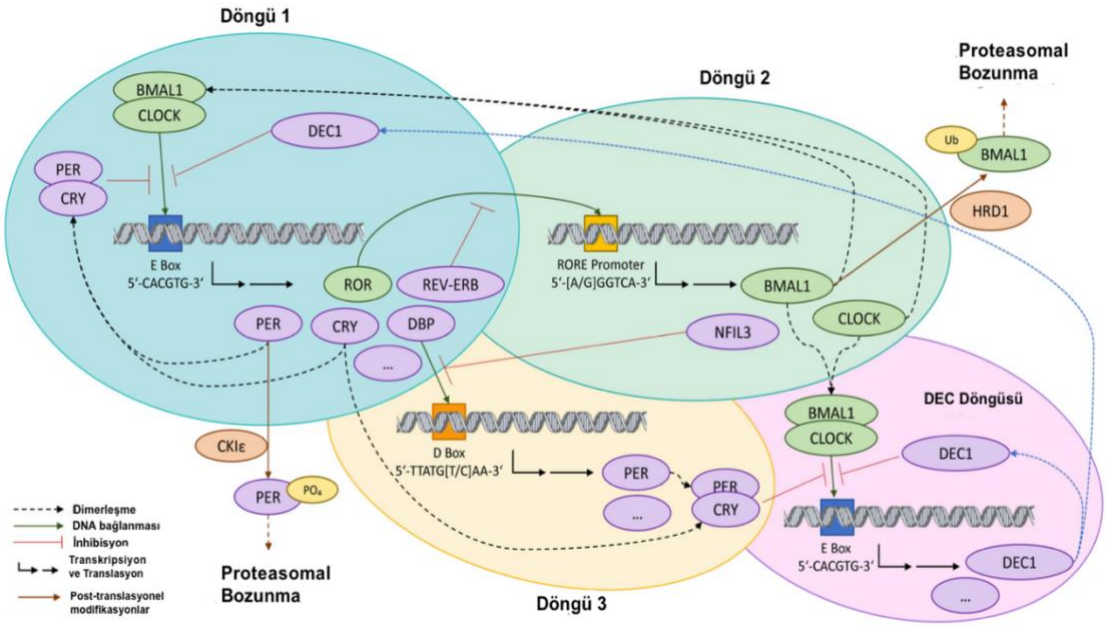
Memelilerde sirkadiyen ritmin ana zamanlayıcısı olarak görev yapan suprakiazmatik nükleus (SCN), hipotalamusta, optik kiyazmanın hemen üzerinde yer alan bir pacemaker olarak görev alır (Hastings vd., 2019). SCN, vücuttaki tüm periferik saatlerin senkronizasyonunu sağlayan merkezi bir osilatördür ve dış çevreden gelen ışık sinyallerini entegre ederek organizmanın biyolojik ritmini çevresel gün-dönüm döngüsüne uygun hâle getirir (Husse vd., 2015).

SCN'nin zamanlayıcı görevi, buradaki nöronların özelleşmiş bir hücre-otonom sirkadiyen saat mekanizmasına sahip olmalarından kaynaklanır (Herzog vd., 2017). Bu hücrelerde, temel saat genleri olan *Clock, Bmal1, Per (Per1, Per2), Cry (Cry1, Cry2), Rev-erbα/β ve Rorα/β/γ* gibi

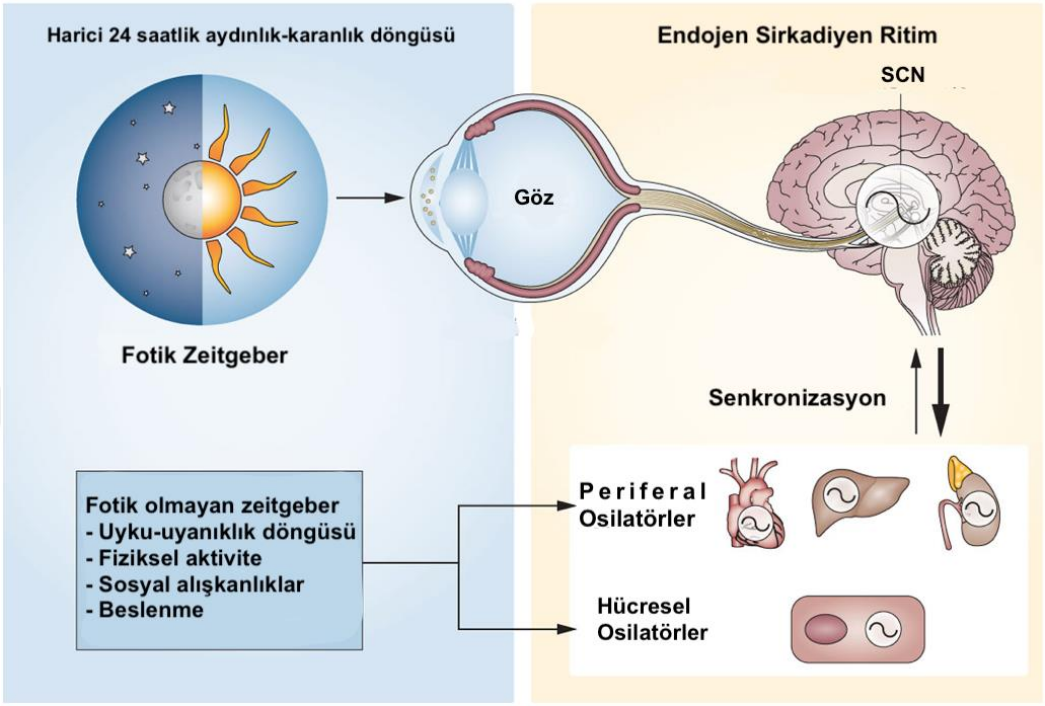
genler etkileşimli geri besleme döngüleri (transkripsiyon-translasyon geri besleme döngüleri; TTFL'ler) aracılığıyla 24 saatlik döngüler oluşturur. Bu genlerin ekspresyonu ve protein düzeylerindeki ritmik değişimler, hücre düzeyinde osilasyonları meydana getirir (Baser vd., 2025; Galinde vd., 2023)

SCN, ışık gibi çevresel ipuçlarını retinadan aldığı fotik sinyaller aracılığıyla algılar. Bu sinyaller, retinohipotalamik yol üzerinden SCN'ye iletilir (Ono vd., 2024). SCN'deki nöronlar, bu bilgiyi kendi iç ritimleriyle entegre ederek hem kendi senkronizasyonlarını sağlar hem de bu zaman bilgisini hormonal ve sinirsel yollarla periferik saatlere iletir. Böylece karaciğer, kalp, böbrek gibi periferik organlardaki sirkadiyen ritimler de merkezi saatle uyumlu hâle gelir (Fagiani vd., 2022; Ramkisoensing & Meijer, 2015; Starnes & Jones, 2023).

SCN'nin hasar görmesi ya da saat genlerinde meydana gelen mutasyonlar, uyku-uyanıklık döngüsü başta olmak üzere birçok davranışsal ve fizyolojik ritmin bozulmasına neden olabilir (Crislip vd., 2021). Bu tür bozukluklar, nörolojik düzensizlikler, enerji metabolizmasında aksaklıklar ve bağışıklık sisteminde dengesizlikler gibi çeşitli sağlık sorunlarıyla ilişkilendirilmiştir (Welsh vd., 2010). Dolayısıyla SCN, yalnızca zamanlama sisteminin merkezi değil, aynı zamanda çevresel ipuçlarına duyarlı dinamik bir yapı olarak organizmanın içsel dengeyi (homeostaz) korumasında kritik bir rol üstlenmektedir (NAKAGAWA & OKUMURA, 2010).



Şekil 2.2: Üç temel geri bildirim döngüsünden oluşan sirkadiyen saatin moleküler yapısı (Salazar & von Hagen, 2023'ten değiştirilerek).



Şekil 2.3: Beyindeki içsel sirkadiyen salınımlar (SCN) ve dış zeitgeberler (ipuçları) **(**Buttgereit vd., 2015'ten değiştirilerek).

2.6. SİRKADİYEN SAATİN DÜZENLENMESİNDE POST-TRANSLASYONEL MODİFİKASYONLAR

Sirkadiyen saat mekanizması, yalnızca transkripsiyonel ve translasyonel geri besleme döngüleri ile sınırlı değildir; bu döngülerin işleyişi, saat proteinlerine uygulanan post-translasyonel modifikasyonlar (PTM'ler) aracılığıyla da düzenlenmektedir (Anna & Kannan, 2021). Bu modifikasyonlar, saat proteinlerinin stabilitesi, nükleer translokasyonu, hücresel lokalizasyonu ve yıkım süreci üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Gallego & Virshup, 2007; Su vd., 2022).

En iyi bilinen post-translasyonel modifikasyonlardan biri olan fosforilasyon, özellikle PER ve CRY proteinlerinin fonksiyonel düzenlenmesinde önemlidir. Kazein kinaz 1δ/ε (CK1δ/ε) tarafından gerçekleştirilen fosforilasyon, PER proteinlerinin hem nükleer girişini hem de proteasomal yıkıma yönlendirilmesini sağlar (Eng vd., 2017). Fosforilasyon sonrasında, PER proteinleri ubikitinasyon yoluyla E3 ubikitin ligazlar (örneğin, β-TrCP) tarafından hedeflenerek

yıkıma gönderilir (Shirogane vd., 2005). Bu, PER/CRY komplekslerinin zamanında degredasyona uğramasını ve döngünün yeniden başlamasını mümkün kılmaktadır.

Bunun yanında, asetilasyon ve O-GlcNAcylation gibi diğer modifikasyonlar da saat proteinlerinin işlevini düzenlemede rol oynamaktadır (E. Y. Kim vd., 2012). Örnek olarak; CLOCK proteininin histon asetiltransferaz (HAT) aktivitesi, hedeflenen saat genlerinin promotor bölgelerinde kromatin yapısını gevşeterek transkripsiyonel aktiviteyi artırmaktadır (Doi vd., 2006). Buna ek olarak, BMAL1 proteini de çeşitli post-translasyonel modifikasyonlara uğramaktadır. Özellikle SUMOilasyon ve asetilasyon gibi modifikasyonlar, BMAL1'in transkripsiyonel aktivitesini ve nükleer lokalizasyonunu etkilemektedir. BMAL1'in asetilasyonu, CLOCK ile olan etkileşimini ve DNA'ya bağlanma yetisini artırarak saat genlerinin ifadesini optimize etmektedir (J. Lee vd., 2008; Y. Lee vd., 2015).

Son olarak CRY proteinlerinin de stabilitesi ise özellikle F-box proteinleri olan FBXL3 ve FBXL21 aracılığıyla düzenlenmektedir (Hirano vd., 2013; Siepka vd., 2007). FBXL3, CRY1 ve CRY2 proteinlerini tanıyarak ubiquitin ligaz kompleksi üzerinden işaretler ve proteazomal yıkımını sağlar (Abdalla vd., 2022). Öte yandan, FBXL21 ise CRY proteinlerine bağlanarak onların yıkımını geciktirir ve çekirdekten sitoplazmaya taşınmasını düzenler (Liu & Zhang, 2016).

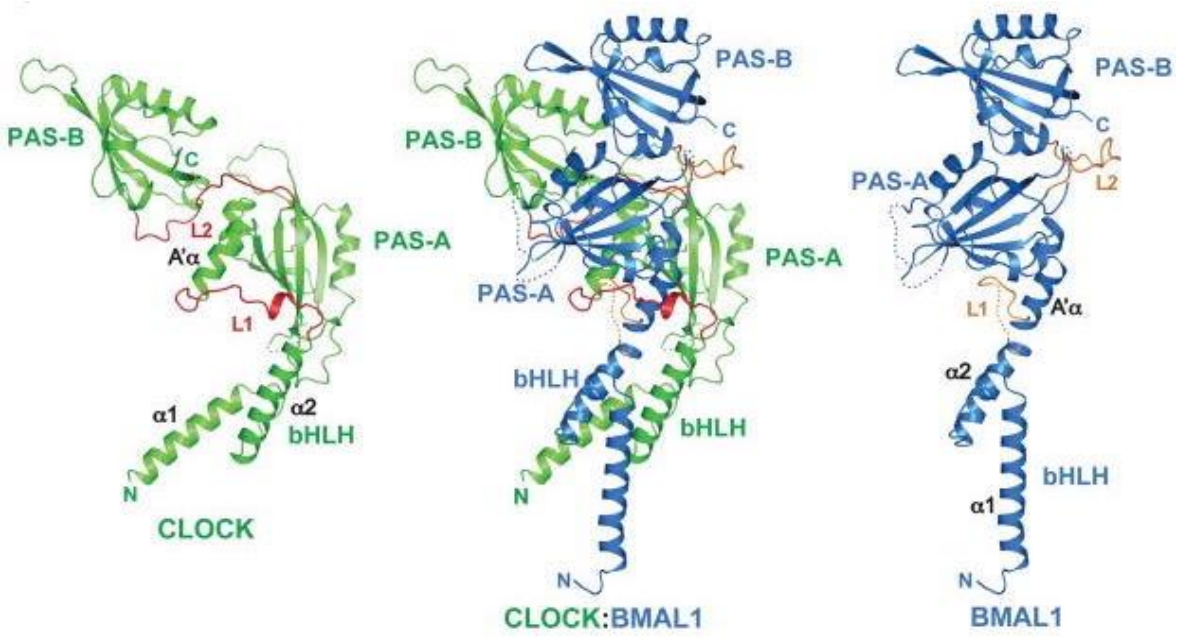
Tüm bu post-translasyonel modifikasyonlar arasında dinamik ve zamana duyarlı bir etkileşim söz konusudur. Bu sayede, saat proteinlerinin hücre içindeki miktarı, lokalizasyonu ve etkileşimleri, çevresel ipuçları zeitgeberlere göre (örneğin ışık, sıcaklık) uyum sağlayacak şekilde ayarlanabilmektedir.

2.7. ÇEKİRDEK SAAT PROTEİNLERİNİN YAPISI

Sirkadiyen saat, ritmik gen ekspresyonunu düzenleyen ve birbirleriyle etkileşen çekirdek saat proteinlerinden oluşur (Lowrey & Takahashi, 2011). CLOCK ve BMAL1, bHLH-PAS (basic helix-loop-helix-PER-ARNT-SIM) ailesine mensup transkripsiyon faktörleridir (N. Huang vd., 2012a). Her iki protein de N-terminal bölgelerinde yer alan bHLH domainleri sayesinde DNA'ya bağlanabilirken, PAS-A ve PAS-B bölgeleri protein-protein etkileşimleri için gereklidir (D. Sharma & Partch, 2024; Xue vd., 2016). Bu etkileşimler sonucunda CLOCK ve BMAL1 bir heterodimer oluşturur ve bu kompleks, E-box (CACGTG) dizilerine bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (Lowrey & Takahashi, 2011).

PER proteinleri (PER1, PER2, PER3)'nin N-terminal bölgelerinde, serin açısından zengin alanlar bulunur ve bu bölgeler Casein Kinase 1 δ/ε (CK1δ/ε) tarafından fosforilasyona uğrayarak PER proteinlerinin stabilitesi, yarı ömrü ve nükleer translokasyonu üzerinde belirleyici rol oynar (Hirayama & Sassone-Corsi, 2009; Xing vd., 2017). Merkezi bölgelerinde yer alan PAS (PER-ARNT-SIM) domainleri, PER proteinlerinin hem kendi aralarında homodimerizasyonuna hem de Cryptochrome (CRY) proteinleri ile etkileşerek PER:CRY heterodimerleri oluşturmasına olanak tanır (Mihut vd., 2025; Xing vd., 2017). Bu heterodimerler daha sonra çekirdeğe taşınarak CLOCK:BMAL1 kompleksinin transkripsiyonel aktivitesini baskılar (Postolache & Raheja, 2016).

CRY proteinleri ise fotoliyaz homolog bölgesi (PHR) ve değişken C-terminal kuyruktan oluşur (Parico & Partch, 2020). CRY proteinleri, PER proteinleriyle heterodimer oluşturarak sirkadiyen saat döngüsünün negatif kolunu düzenlerler. Bu etkileşim, PER'in C-terminali ile CRY'nin coiled-coil heliksi arasında gerçekleşir ve çinko iyonu aracılığıyla stabilize edilir (Ozber vd., 2010; Schmalen vd., 2014). Buna ek olarak CRY proteinlerinin C-terminal kuyruğu, sekonder cebi ve FAD bağlanma cebi sırasıyla BMAL1, CLOCK ve FBXL3/21 ile olan etkileşimleri açısından önemlidir (Gul vd., 2021; Miller vd., 2021; Rosensweig vd., 2018).



Şekil 2.4: CLOCK:BMAL1 heterodimer yapısı, bHLH, PAS-A ve PAS-B bölgelerini içermektedir. Bağlayıcı (linker) bölgeler kırmızı veya turuncu renkte gösterilmiştir- (N. Huang vd., 2012).

2.8. SİRKADİYEN SAAT VE HASTALIK İLE İLİŞKİSİ

Sirkadiyen saat, CLOCK, BMAL1, PER, CRY, REV-ERB ve ROR gibi çekirdek saat genleri tarafından düzenlenen geri besleme döngüleri ile çalışır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar ya da işlev bozuklukları, biyolojik ritimlerin bozulmasına yol açarak çeşitli hastalıkların gelişiminde rol oynar (M. Ding vd., 2024). İlk olarak PER2 geninde meydana gelen S662G (Ser662Gly) mutasyonu, "Familial Advanced Sleep Phase Syndrome" (FASPS) olarak bilinen, bireylerin normalden çok daha erken uyuyup erken uyanmasına neden olan sirkadiyen uyku bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir (Gu vd., 2012; Toh vd., 2001). Benzer şekilde, CK1δ geninde bulunan T44A mutasyonu da PER2 fosforilasyonunu bozarak FASPS fenotipine katkı sağlamaktadır (Xu vd., 2005).

Diğer taraftan, CRY1 geninde gözlenen ve CRY1Δ11 varyantı olan c.1657+3A>C splicing mutasyonu, "Familial Delayed Sleep-Wake Phase Disorder" (DSWPD) olarak bilinen ve bireylerin uykuya geç başlama eğilimi gösterdiği bir durumla ilişkilendirilmiştir (Patke vd., 2017; Smieszek vd., 2021). Bunlara ek olarak, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda uyku düzeninin bozulduğu, Parkinson hastalarında ise hastalığın erken evrelerinde uyku alışkanlıklarında değişikliklerin ortaya çıktığı görülmektedir. Bu değişiklikler, sirkadiyen ritmin genliğinin azalması ve faz kaymaları ile ilişkilidir (Shen vd., 2023; Videnovic & Golombek, 2013).

Onkoloji alanında ise saat gen mutasyonlarının tümör mikroçevresinde hücre döngüsü, apoptoz ve DNA hasar onarımı gibi süreçleri etkilediği bilinmektedir (Battaglin vd., 2021). Örneğin, PER1 ve PER2 genlerinin ekspresyonunun baskılanması, çeşitli solid tümörlerde (özellikle meme kanserinde) hücresel proliferasyonu artırarak tümör ilerleyişine katkı sağlamaktadır (Yang vd., 2009).

Metabolik hastalıklarla ilişkili olarak, BMAL1 geni knockout edilen hayvan modellerinde glukoz tolerans bozukluğu, insülin direnci ve obezite geliştiği gösterilmiştir (Jouffe vd., 2022). BMAL1 geninin insanlarda promotor bölgesindeki polimorfizmlerin de tip 2 diyabet ve metabolik sendromla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Y.-D. Yang vd., 2023). Ayrıca, CLOCK geninde bulunan 3111T/C polimorfizmi, depresyon, bipolar bozukluk ve uykusuzluk gibi

nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Ozburn vd., 2016; Waddington Lamont vd., 2007). Sonuç olarak, sirkadiyen saat genlerinde meydana gelen mutasyonlar veya polimorfizmler, sadece uyku-uyanıklık ritimlerini değil; metabolik, nörolojik, psikiyatrik ve onkolojik hastalıkları da doğrudan etkileyen temel moleküler mekanizmaları bozmaktadır.

2.9. SİRKADİYEN SAATİ MODÜLE ETME POTANSİYELİNE SAHİP KÜÇÜK MOLEKÜLLER

Sirkadiyen saatin insan yaşamındaki temel işlevi ve modern yaşam tarzının bu döngüsel sistemi bozma riski, bilim insanlarını sirkadiyen sistemin farmakolojik olarak düzenlenmesine yönelik çözümler geliştirmeye yönlendirmiştir. Bu bağlamda, saat proteinlerini hedef alan küçük moleküller, ritmik biyolojik süreçlerdeki aksaklıkları düzeltme potansiyeli taşımaktadır. Genetik müdahalelere kıyasla, küçük moleküller zamanlaması kontrol edilebilir, dozu ayarlanabilir ve geri dönüşlü etkiler sunar. Bu özellikleri sayesinde moleküler düzeyde kritik müdahalelere olanak sağlarlar (Jiao vd., 2024; Y. Lee vd., 2021). Sirkadiyen ritmi modüle eden küçük moleküllerin belirlenmesinde iki ana yaklaşım öne çıkmaktadır. İlk yöntem, geniş çaplı kimyasal kütüphanelerin lüsiferaz raporlayıcı gen taşıyan hücre sistemleri kullanılarak taranmasıdır. Bu hücreler genellikle PER2::LUC veya Bmal1-dLuc gibi sirkadiyen ritme duyarlı raporlayıcılarla donatılmıştır (Hirota & Kay, 2015). Senkronizasyon işlemi sonrası (forskolin ya da deksametazon ile), hücreler çeşitli küçük moleküllerle işleme tabi tutulur ve biyolüminesans sinyalleri birkaç gün boyunca izlenir (Wallach & Kramer, 2015). Ritimde faz, genlik veya periyot değişikliklerine yol açan bileşikler, potansiyel aday olarak seçilir (Doruk vd., 2020). Bu tarama yöntemleriyle çok sayıda bileşik tanımlanmış ve bunlardan biri de KL001 adlı CRY proteinlerini stabilize eden moleküldür (Hirota vd., 2012).

İkinci yöntem ise, yapı-temelli ilaç tasarımı yaklaşımlarına dayanmaktadır. Sirkadiyen saat proteinlerinin kristal yapılarının belirlenmesi sayesinde, bu proteinlerle bağ kurabilecek moleküller sanal ortamda taranmakta, ardından laboratuvar koşullarında fonksiyonel etkileri doğrulanmaktadır (Gul & Kavakli, 2022). Bu yöntem sayesinde, CLOCK proteinine bağlanabilen CLK8 gibi moleküller keşfedilmiştir (Doruk vd., 2020).

Bazı küçük moleküller ise, daha önce bilinen biyolojik etkileri sayesinde sirkadiyen sistemi etkileme kapasiteleri açısından sonradan değerlendirilmiştir. Örneğin, bir CK1 inhibitörü olan IC261, sirkadiyen periyodun uzamasına neden olduğu gözlemlenerek bu alanda tanımlanmıştır

(van Ooijen vd., 2013). Ayrıca, GSK-3β inhibitörleri gibi moleküllerin de saat ritmi üzerinde etkili oldukları ortaya konmuştur (Besing vd., 2015). Yeni bir çalışmada ise, CRY1 proteininin FAD bağlanma bölgesi sanal olarak taranmış ve M47 adlı küçük bir molekül keşfedilmiştir. M47, ubikitinasyonunu artırarak CRY1'in yarı ömrünü düşürür ve bu da sirkadiyen periyodu uzatır. M47'nin, UV taklit edici bir ajan olan oksaliplatin ile tedavi edildiğinde Ras-transformed p53-null fare fibroblast hücre hattında apoptozu artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, tümör insidansı yaşını geciktirerek p53 nakavt farelerinin yaşam süresini de artırır (Gul vd., 2022). Tüm bu bulgular, küçük moleküllerin sirkadiyen biyolojiyi düzenlemede güçlü araçlar olduğunu ve potansiyel terapötik uygulamalar için önemli bir kaynak oluşturduğunu göstermektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bu çalışmada çeşitli memeli hücre hatları kullanılmıştır: İnsan embriyonik böbrek hücre hattı HEK 293T, Bmal1 promotoru kontrolünde destabilize lüsiferaz geni eksprese eden insan osteosarkom hücre hattı U2OS Bmal1-dLuc. Tüm hücreler, yüksek glukoz içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM, (Gibco, Cat. No.: 11965092) içinde %10 ısı ile inaktive edilmiş Fetal Bovine Serum FBS (Gibco, Cat. No.: 16000044) ve %1 Penicillin-Streptomycin karışımı (Gibco, Cat. No.: 15140122) eklenmiş D10 besiyerinde kültüre edilmiştir. Hücreler, %95 nem, %5 CO_2 içeren 37°C sıcaklıktaki inkübatörlerde muhafaza edilmiştir. Hücre pasajlaması, hücrelerin konfluens seviyesine ulaşması ya da besiyerinin tükenmesi durumlarında gerçekleştirilmiştir. Öncelikle eski besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmış ve hücreler 1X fosfat tamponlu salin (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1.8 mM KH_2PO_4, pH 7.4) ile yıkanmıştır. Ardından hücrelerin yüzeyden ayrılması için Trypsin-EDTA (Multicell, Cat. No.: 325-043 EL) çözeltisi eklenmiş ve yaklaşık 2 dakika inkübe edilmiştir. Hücreler tamamen ayrıldıktan sonra, tripsini inaktive etmek amacıyla en az 3 katı hacminde D10 besiyeri eklenmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu uygun oranlarda (örneğin 1:6) yeni kültür kaplarına (örneğin 10 cm petri kapları, NEST Biotechnology) aktarılmıştır. Ayrıca hücreler periyodik olarak e-Myco plus Mycoplasma PCR Detection Kit (LiliF Diagnostics, Kat. No.: 25237) kullanılarak mikoplazma kontaminasyonu açısından kontrol edildi.

3.2. SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ (MTT TESTİ)

Sitotoksisite analizlerinde insan osteosarkom hücre hattı U2OS Bmal1-dLuc kullanılmıştır. Hücreler, %10 fetal bovin serumu (FBS), 100 µg/mL streptomisin, 100 µg/mL penisilin ve 2 mM L-Glutamin içeren filtrelenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ortamında, %5 CO_2 ve %95 nem koşullarında 37°C'de kültüre edilmiştir. Hücreler düzenli olarak pasajlanarak sağlıklı büyüme koşulları korunmuştur. Deneysel uygulamalarda, her bir kuyucuğa 4000 hücre gelecek şekilde şeffaf 96 kuyucuklu kültür plakalarına üçlü tekrarlarla ekim yapılmıştır. Hücreler 48 saat inkübe edildikten sonra, farklı konsantrasyonlarda test bileşikleri içeren DMEM ortamı ile muamele edilmiştir (final DMSO konsantrasyonu %0.4 olacak şekilde ayarlanmıştır). Ardından hücreler 48 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon

süresinin sonunda, hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla MTT çözeltisi (neoFroxx, Cat. No.: 298-93-1) (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür; final konsantrasyon: 1 mg/mL) DMEM ile hazırlanarak hücrelerin üzerine eklenmiştir. Hücreler 4 saat MTT çözeltisi ile inkübe edildikten sonra, oluşan mor formazan kristallerinin çözünmesi için ortam, DMSO:EtOH (1:1) karışımı ile değiştirilmiştir. Elde edilen renk yoğunluğu, mikroplaka okuyucusu (Synergy H1, BioTek Instruments) kullanılarak 600/690 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Hücre canlılığı, absorbans değerlerine göre hesaplanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak, %5 DMSO ile muamele edilen hücreler kullanılmıştır. Her molekül veya DMSO için her deneyde en az üç tekrar yapıldı ve her deney üç kez gerçekleştirildi.

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)}: \frac{(\text{A600 nm} - \text{A690 nm})\ \text{İlaç}}{(\text{A600 nm} - \text{A690 nm})\ \text{DMSO}} \text{ x } 100$$

3.3. PROTEİN YIKIM (DEGRADASYON) ANALİZİ

Protein degradasyonu analizi, geçici olarak transfekte edilmiş HEK 293T hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Her bir kuyucuğa 4×10^4 hücre gelecek şekilde, opak 96 kuyucuklu plaklara üçlü tekrarlar halinde hücre ekimi yapılmıştır. Deneylerde ters transfeksiyon (reverse transfection) yöntemi kullanılmıştır. Hücreler, deneyin tasarımına bağlı olarak pcDNA4-Luc (4 ng) veya pcDNA4-Bmal1:Luc (50 ng) plazmitleri ile, pCMV-Sport6-CLOCK plazmidi (250 ng) varlığında veya yokluğunda, PEI (final konsantrasyon: 6 ng/µL) aracılığıyla transfekte edilmiştir. Her koşulda toplam plazmit miktarı 300 ng ile sınırlandırılmıştır. Eğer transfekte edilen plazmit miktarı 300 ng'nin altında kalıyorsa, eksik miktar boş pCMV-Sport6 plazmiti ile tamamlanmıştır. Ters transfeksiyonun ardından hücrelere uygun dozlarda E9 molekülü uygulanmış ve hücreler 37°C'de, %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Ertesi gün, hücre ortamına HEPES-NaOH tamponu (final konsantrasyon: 10 mM, pH 7.2) ve lüsiferin (final konsantrasyon: 0.4 mM) (Promega, Kat. No.: E160C) eklenerek, hücreler 1 saat daha 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra, protein sentezini durdurmak amacıyla hücreler siklohekzimitin (CHX) (final konsantrasyon: 20 µg/mL) (Sigma, Kat. No.: 66819) ile muamele edilmiştir. Plaka, optik olarak şeffaf bir film olan PCR sızdırmazlık filmi (NEST, Kat. No.: 410001) ile kapatılmış ve Synergy H1 Mikroplaka Okuyucusuna (Bio-Tek Instruments) yerleştirilmiştir. Hücrelerden gelen lüminesans sinyalleri, 32°C'de 24 saat boyunca her 15 dakikada bir kaydedilmiştir. Protein yarı ömrü hesaplamalarında tek evreli (one-phase) üstel

bozunma (exponential decay) fonksiyonu kullanılmıştır. Her molekül veya DMSO için her deneyde en az üç tekrar yapıldı ve her deney üç kez gerçekleştirildi.

3.4. SİRKADİYEN SALINIMLARIN GERÇEK ZAMANLI TAKİBİ

Sirkadiyen ritim salınımlarının gerçek zamanlı takibi için U2OS Bmal1-dLuc hücre hattı kullanılmıştır. Lüminesans sinyallerinin kaydedilmesi amacıyla LumiCycle 32 cihazı (Actimetrics, ABD) kullanılmıştır. Hücreler, 35 mm çapındaki hücre kültürü kaplarına, her biri 4.5×10^5 hücre içerecek şekilde ekilmiş ve bir gece boyunca 37°C'de, %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Ertesi gün, hücrelerin senkronizasyonu amacıyla, hücre ortamı 0.1 µM Deksametazon (Sigma, Cat. No.: D8893) içeren DMEM ile değiştirilmiştir. Hücreler bu ortamda 2 saat inkübe edildikten sonra, bu karışım atılmış ve yerine kayıt için hazırlanmış karışım ortamı içeren E9 karışımı eklenmiştir. Bu ortam; 10 g düşük glukozlu DMEM tozu (Sigma, Cat. No.: D2902), 3.5 mg/mL D(+) glukoz (Sigma, Cat. No.: G7021), 0.35 mg/mL sodyum bikarbonat (Sigma, Cat. No.: S5761), 10 mM HEPES (Multicell, Cat. No.: 330-050-EL), %5 FBS (Gibco 16000044), %1 NEAA (Multicell 321-011-EL), 25 U/mL streptomisin-penisilin (Gibco 15140-122) ve 0.1 mM luciferin içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre kültür kapları buharlaşmayı önlemek amacıyla silikon gres (Winkel, Cat. No.: W150212-1) ile kapatılmış ve hemen ardından LumiCycle cihazına yerleştirilmiştir. Cihaz, her bir kaptan gelen lüminesans sinyallerini 10 dakikalık aralıklarla, 37°C'de 5–7 gün boyunca sürekli olarak kaydetmiştir. Elde edilen veriler, sirkadiyen ritimdeki değişimlerin değerlendirilmesi amacıyla LumiCycle Analysis yazılımı (Actimetrics) kullanılarak analiz edilmiştir.

3.5. SDS-PAGE VE WESTERN BLOT ANALİZİ

Bu çalışmada protein izolasyonu ve analizleri için U2OS hücre hattı kullanılmıştır. Öncelikle hücrelerin üzerindeki kültür ortamı (D10) uzaklaştırılmış ve hücreler 1X PBS ile yıkanmıştır. Ardından hücreler üzerine Trypsin-EDTA eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanmış; bu işlem yaklaşık 1–2 dakika sürmüştür. Tripsin aktivitesi, ortam üzerine D10 eklenerek durdurulmuştur. Hücre süspansiyonu mikro santrifüj tüplerine toplanmış ve 4°C'de, 3500 g kuvvetinde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatan atılmış, hücre pelletleri soğuk 1X PBS ile yıkandıktan sonra aynı koşullarda yeniden santrifüj edilmiştir. Son olarak süpernatan tekrar uzaklaştırılmış, hücre pelletleri -20°C'de protein izolasyonu yapılana kadar saklanmıştır.

U2OS hücrelerinden elde edilen pelletler buz üzerinde çözündürülmüş ve RIPA tamponu (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, %1 Triton X-100, %0.1 SDS, taze eklenmiş %1 proteaz inhibitör kokteyli (PIC) (Thermo Scientific, Cat. No.: 78429)ile lizize edilmiştir. Tüpler 15 dakika buzda bekletildikten sonra vortexlenmiş ve tekrar 15 dakika buzda tutulmuştur. Sonrasında 15.000 g'de, 4°C'de, 15 dakika santrifüj edilerek süpernatan kısmındaki çözünmüş proteinler yeni tüplere alınmıştır. Çökelti kısmı atılmıştır.

Protein konsantrasyonları, Pierce 660 nm Protein Tayin Reaktifi (Thermo Scientific, Cat. No.: 22660) kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerden 1 µL alınarak 9 µL saf su ile seyreltilmiş, 96 kuyucuklu şeffaf plakalara teknik ikili tekrarlarla yüklenmiştir. RIPA tamponu da boş (blank) kontrol olarak kullanılmıştır. Her kuyucuğa 150 µL reaktif eklenmiş ve Synergy H1 Mikroplaka Okuyucu (Bio-Tek Instruments) ile 660 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Protein miktarları, BSA standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen örneklere 1X Laemmli yükleme tamponu (250 mM Tris-HCl pH 6.8, %40 gliserol, %4 SDS, %0.005 bromofenol mavisi, %10 β-merkaptoetanol) eklenmiş, 95°C'de 10 dakika kaynatılmış ve -20°C'de saklanmıştır.

U2OS hücrelerinden izole edilen proteinler, hedef proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırmak ve kantitatif analiz yapmak amacıyla SDS-PAGE yöntemi ile elektroforeze tabi tutulmuştur. Örneklerden 10–15 µg protein, %8–12 yoğunlukta poliakrilamid jel içerisine yüklenmiştir. Jeller önce 90V'de 30 dakika, ardından 110V'de 60 dakika çalıştırılmıştır.

Western Blot işlemi kapsamında, proteinler metanol ile aktive edilmiş PVDF membranlara (Merck Millipore, 0.45 µm pore size Hyrophobic Transfer Membrane, Cat. No.: IPVH00010), transfer edilmiştir. Transfer işlemi 95V'de 90 dakika sürmüştür. Membranlar, %5 süt çözeltisi (TBS-T içinde çözünmüş yağsız süt tozu) ile 1 saat bloklanmıştır. Bloklama sonrası membranlar, birincil antikorlarla oda sıcaklığında 2 saat ya da 4°C'de 16–19 saat inkübe edilmiştir. Ardından membranlar TBS-T ile üç kez 5'er dakika yıkanmış, ikincil antikorlarla 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona alınmıştır. Son olarak tekrar aynı şekilde yıkanarak kendin yap ECL çözeltisi ile görüntülenmiş ve ChemiDoc Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad) kullanılarak bantlar kaydedilmiştir.

Deneylerde kullanılan birincil antikorlar: anti-PER2 (Proteintech, Kat. No.: 67513-1-1g), anti-CLOCK (Bethyl, Kat. No.: A302-618A), anti-BMAL1 (Santa Cruz Biotechnology, Kat. No.:

sc-365645), anti-CRY1 (Bethyl, Kat. No.: A302-614A), anti-ß-ACTIN (Cell Signaling, Kat. No.: 3700S), anti-TUBULIN (Proteintech, Kat. No.: 11224-1-AP), anti-HISTONE H3 (Proteintech, Kat. No.: 17168-1-AP), anti-FLAG (Cell Signaling, Kat. No.: 8146S), anti-MYC (Cell Signaling, Kat. No.: 2276S).

Deneylerde kullanılan ikincil antikorlar: anti-Mouse IgG, HRP bağlantılı (Cell Signaling, Kat. No.: 7076S), anti-Rabbit IgG, HRP bağlantılı (Cell Signaling, Kat. No.: 7074S).

3.6. TOTAL RNA İZOLASYONU VE RT-QPCR ANALİZİ

E9 küçük molekülünün çekirdek saat genleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla RT-qPCR yöntemi kullanılmıştır. Bu analiz için, senkronize edilmemiş U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinden toplam RNA, TRIzol reaktifi (Invitrogen, Kat. No. 15-596-018) kullanılarak izole edilmiştir. Hücreler 1 mL TRIzol ile süspanse edildikten sonra her örneğe 200 µL kloroform eklenmiş ve karışımlar oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında örnekler 4°C'de 14.000 xg'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan sulu faz dikkatlice yeni bir tüpe alınarak her örnek için 1:1 oranında izopropanol ve 12 µg glikojen ile karıştırılmıştır. Bu karışımlar -80°C'de 1,5 saat boyunca inkübe edilmiştir. Takiben örnekler 4°C'de 14.000 xg'de 20 dakika daha santrifüj edilerek tüpün dibinde oluşan pelletler 1 mL %75 etanol ile üç kez yıkanmıştır. Her yıkama sonrası 5 dakika 14.000 xg'de santrifüj işlemi uygulanmış ve süpernatanlar uzaklaştırılmıştır. Son yıkama sonrasında pelletler oda sıcaklığında hava ile kurutulmuş, ardından 30 µL nükleaz içermeyen su ile çözülmüştür. RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık ölçümleri, NanoDrop 2000 spektrofotometresi (Thermo Scientific) ile gerçekleştirilmiştir. RNA bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla, örnekler %0.8 oranında hazırlanmış agaroz jel üzerine yüklenmiş ve 100V gerilimde 15 dakika süreyle jel elektroforezi uygulanmıştır. Jel hazırlığında Tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu, Dietilpirokarbonat (DEPC) ile muamele edilmiş su ile hazırlanmıştır. Deney sürecinde olası kontaminasyonunu önlemek amacıyla tüm ekipmanlar RNaseZAP (Sigma R2020) ile dezenfekte edilmiştir. İzole edilen RNA'lar cDNA sentezi için hemen kullanılmış, kullanılmayan kısımlar -80°C'de saklanmıştır.

RNA izolasyonunun ardından, toplam RNA'ların cDNA sentezi için Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti (Thermo Scientific, Cat. No.: K1622) kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir reaksiyon için 500 ng toplam RNA, 1 µl Oligo(dT) 20 (Genaxxon Bioscience, Cat. No.: M3039.0150) primer ve nükleaz içermeyen su ile toplam hacim 12 µl'ye

tamamlanarak hazırlanan karışım, kısa santrifüj işleminden sonra 65 °C'de 5 dakika inkübe edildi ve ardından 4 °C'de bekletildi. Bu sırada, 4 µl 5X reaksiyon tamponu, 1 µl Ribolock RNaz inhibitörü, 2 µl dNTP karışımı (10 mM) ve 1 µl RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase içeren ana karışım hazırlandı. İlk adım sonrası 8 µl ana karışım her bir tüpe eklenerek toplam reaksiyon hacmi 20 µl'ye ulaştırıldı. Reaksiyon, 42 °C'de 1 saatlik inkübasyon ve 70 °C'de 5 dakika ile sonlandırıldı. Elde edilen cDNA'lar, nükleaz içermeyen su ile 1:5 oranında seyreltilerek -20 °C'de saklandı.

Gerçek zamanlı PCR (qPCR) analizleri için her örnek özelinde; 10 µL 2X SensiFAST SYBR® No-ROX Mix (Bioline, Cat. No.: CSA-01133), 1 µL ileri ve geri primer karışımı (her bir primerin son konsantrasyonu 0.5 µM), 6 µL nükleaz içermeyen su ve 3 µL 1:40 oranında seyreltilmiş cDNA içeren bir reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Kullanılan tüm primer dizileri Tablo 3.1'de ayrıntılı olarak verilmiştir. RPLP0 geni, normalize edici referans gen olarak seçilmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımları Bio-Rad CFX Connect Gerçek Zamanlı PCR sistemi ile aşağıdaki protokole göre yürütülmüştür: Başlangıçta 95 °C'de 7 dakikalık denatürasyon adımının ardından, 40 döngü boyunca sırasıyla 95 °C'de 8 saniye denatürasyon, 60 °C'de 10 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 20 saniye uzama aşamaları uygulanmıştır. Her döngü sonunda floresans sinyalleri kaydedilmiştir. Amplifikasyonun tamamlanmasının ardından, örnekler sırasıyla 95 °C'de 8 saniye, 70 °C'de 5 saniye ve 90 °C'de 5 saniye inkübe edilmiştir. Son floresan sinyal kaydı 70 °C'de 5 saniyelik inkübasyonun ardından alınmıştır. Gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırmalı analizi, delta-delta Ct (2^-ΔΔCt) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1: RT-qPCR analizi için kullanılan ileri (forward) ve ters (reverse) primer dizileri.

Gen Adı	İleri Primer Dizisi (5'ten 3' yönüne doğru)	Ters Primer Dizisi (5'ten 3' yönüne doğru)
hsRPLP0	TGTGGGAGCAGACAATGTGG	CATTCCCCCGGATATGAGGC
hsCLOCK	GGCACCACCCATAATAGGGTA	TGTTGCCCCTTAGTCAGGAAC
hsBMAL1	GCCCATTGAACATCACGAGTAC	CCTGAGCCTGGCCTGATAGTAG
hsPER2	AGTTGGCCTGCAAGAACCAG	ACTCGCATTTCCTCTTCAGGG
hsCRY1	ACAGGTGGCGATTTTTGCTTC	TCCAAAGGGCTCAGAATCATACT
hsDBP	GAGGAACTTAAGCCCCAGCC	CTCGTTGTTCTTGTACCGCC

3.7. HÜCRE İÇİ FRAKSİYONLAMA VE WESTERN BLOT ANALİZİ

E9 molekülünün çekirdek saat proteinlerinin hücre içi lokalizasyonu üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla sitoplazmik ve nükleer fraksiyonlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. U2OS Bmal1-dLuc hücreleri, her bir 6 kuyucuklu plaka kuyucuğuna 4×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ertesi gün, hücrelere %0.4 oranında DMSO (kontrol) ve 20 µM E9 içeren karışım uygulanmıştır. Küçük molekül maruziyetinden 24 saat sonra hücreler toplanarak fraksiyonlama işlemi yapılmıştır.

Hücreler buz soğukluğundaki 1 mL 1X PBS ile toplanarak 5000xg'de 7 dakika, 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatan atıldıktan sonra pelletler, 200 µL Sitoplazmik Lizis Tamponu (Cytosolic Lysis Buffer, CLB) (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0, %0.05 NP-40, 1X proteaz inhibitör karışımı - PIC) ile yeniden süspanse edilerek buz üzerinde 10 dakika inkübe edilmiştir. Ardından örnekler 660xg'de 5 dakika (4°C) santrifüj edilmiştir. Üst faz (süpernatan) sitoplazmik fraksiyon olarak yeni tüplere alınırken, kalan pelletler 200 µL CLB ile üç kez yıkanmıştır. Her yıkama adımının ardından aynı santrifüj koşulları uygulanmıştır.

Yıkama sonrası kalan pelletler, 100 µL Nükleer Lizis Tamponu (Nuclear Lysis Buffer, NLB) (20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, %10 Gliserol, 1X PIC) ile süspanse edilmiştir. Hücreler, BANDELIN SONOPULS HD 2070 sonikatör cihazı kullanılarak %60 güçte, her biri 10 saniye süren üç döngü halinde iki kez sonikasyona tabi tutulmuştur. Ardından

hem nükleer hem de sitoplazmik fraksiyonlar 15000xg'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen fraksiyonlar yeni tüplere alınarak Western blot analizine tabi tutulmuştur.

Western blot için her numune için 15 g protein %12 SDS jele yüklendi. Deneylerde kullanılan birincil antikorlar: anti-PER2 (Proteintech, Kat. No.: 67513-1-1g), anti-CLOCK (Bethyl, Kat. No.: A302-618A), anti-BMAL1 (Santa Cruz Biotechnology, Kat. No.: sc-365645), anti-CRY1 (Bethyl, Kat. No.: A302-614A), anti-CRY2 (Bethyl, Kat. No.: A302- 615A), anti-□-TUBULIN (Proteintech, Kat. No.: 11224-1-AP) sitozolik fraksiyonlar için dahili kontrol olarak kullanıldı ve anti-HISTONE H3 (Proteintech, Kat. No.: 17168-1-AP) nükleer fraksiyonlar için dahili kontrol olarak kullanıldı.

3.8. KO-İMMUNOPRESİPİTASYON (CO-IP) ANALİZİ

HEK293T hücreleri, her bir kuyuya 0.3×10^6 hücre olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekilmiş ve %10 FBS ve %1 Penicillin/Streptomycin içeren DMEM besiyerinde, transfeksiyondan 24 saat önce kültüre alınmıştır. Transfeksiyonun yapılacağı gün, hücrelerin yaklaşık %70–80 konfluente ulaşmış olması sağlanmıştır. Plazmid karışımı; 500 ng FLAG etiketli Bmal1-pcDNA-4-A ve 1000 ng Clock-pCMV-Sport6 plazmidleri ile hazırlanmış ve 200 µL DMEM içerisinde 3 µL PEI (Polietilenimin) reaktifi ile karıştırılarak oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Ardından bu karışım hücrelerin bulunduğu kültür plakasına eklenmiştir.

Transfeksiyon sonrası hücreler, yukardaki bölümlerde açıklandığı şekilde toplanmıştır. Elde edilen hücre pelletleri, 300 µL soğuk lizis tamponu (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, %5 gliserol, %1 Triton X-100, 100 µM PMSF ve 1:100 oranında proteaz inhibitör kokteyli) ile süspanse edilerek buz üzerinde 30 dakika bekletilmiştir.

FLAG etiketli proteinlerin saflaştırılması için kullanılan affinite reçineleri (Sigma, Katalog No: A4596) önce TBS ile üç kez yıkanmış, ardından 0.1 M Glisin-HCl (pH 3.5) ile aktive edilmiştir. Hücre lizatlarının süpernatanları, dengeye getirilmiş reçinelerin üzerine aktarılmış ve karışım +4°C'de gece boyunca dikey rotasyonda inkübe edilmiştir. Ertesi gün, örnekler 5000 g'de 30 saniye santrifüj edilerek süpernatanlar uzaklaştırılmış ve reçineler TBS ile üç kez yıkanmıştır.

Son yıkama adımının ardından, reçinede tutulan proteinler 95°C'de 7 dakika boyunca ısıl işlem görmüş Laemmli tamponu (250 mM Tris-HCl pH 6.8, %40 gliserol, %4 SDS, %0.02 bromofenol mavisi, %10 taze hazırlanmış β-merkaptoetanol) ile çözülerek izole edilmiştir. Elde

edilen protein örnekleri Western blot analizine tabi tutulmuştur. İlk olarak membran, anti-FLAG antikoru (Sigma, A9469) ile inkübe edilmiştir. BMAL1 proteinini saptamak amacıyla HRP (Horseradish Peroxidase) ile konjuge edilmiş anti-mouse sekonder antikor (Santa Cruz Biotechnology, Katalog No: 516102) kullanılmıştır. Membran, Advansta Strip-It tamponu (Katalog No: R03722-D50) ile sıyrıldıktan sonra, CLOCK proteinini tespit etmek için anti-CLOCK primer antikoru (Bethyl, A302-617A) ile yeniden inkübe edilmiş ve ardından HRP-konjuge anti-rabbit sekonder antikor (Cell Signaling Technology, 7074) ile görselleştirme yapılmıştır.

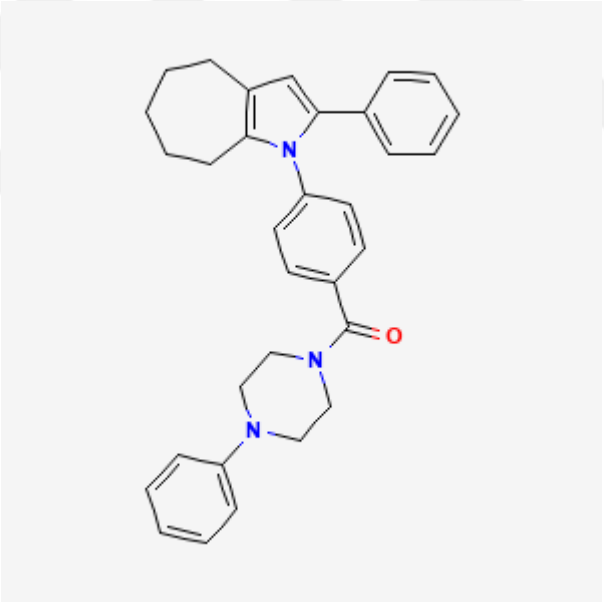
3.9. İSTATİKSEL ANALİZ

Veriler ortalama ± SEM (Ortalamanın Standart Hatası) olarak ifade edilmiş ve istatistiksel anlamlılık GraphPad Prism (GraphPad Software, California, ABD) programı kullanılarak Student's t-testi ile tek yönlü ANOVA veya iki yönlü ANOVA uygulandı değerlendirilmiştir. Her deneysel kurulum en az üç biyolojik tekrar içeriyordu. MTT toksisite testi ve protein yıkım (degredasyon) testi her biyolojik tekrarda 4 teknik tekrar içeriyordu ve RT-qPCR her biyolojik tekrarda 2 teknik tekrar içeriyordu. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri *$p< 0.05$, **$p< 0.01$ ve ***$p< 0.001$ olarak ****$p < 0.0001$ kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. KÜÇÜK MOLEKÜLLERİN YAPI TABANLI İLAÇ TASARIMI YÖNTEMİYLE *İN SİLİKO* TARAMA SÜRECİ

Çekirdek saat proteinlerinin kristal yapılarının belirlenmesi, CLOCK ve BMAL1'in benzer bHLH, PAS-A ve PAS-B bölgeleri içerdiğini ve bu proteinlerin üç ayrı etkileşim yüzeyi üzerinden birbirleriyle bağlandığını göstermiştir. PAS bölgeleri, çeşitli kofaktörlerle etkileşime girebildikleri için ilaç geliştirme açısından uygun hedeflerdir. Daha önce yapılan bir çalışmada (Doruk vd., 2020) yaklaşık 2 milyon küçük molekül CLOCK proteinine karşı sanal taramaya tabi tutulmuştur. Bu tarama sonucunda bağlanma enerjileri yüksek olan 94 adet ticari olarak ulaşılabilir küçük molekül sentezlenmiştir. Bu moleküllerden biri olan E9, detaylı olarak analiz edilmiş ve sirkadiyen saat üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir.

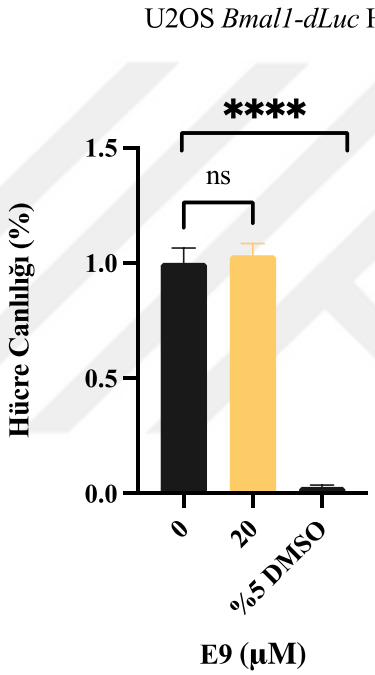


Şekil 4.1: E9'un kimyasal yapısı. 1-Phenyl-4-(4-{2-phenyl-1H,4H,5H,6H,7H,8H-cyclohepta[B]pyrrol-1-YL}benzoyl)piperazine.

4.2. SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ (MTT TESTİ) SONUÇLARI

Bu testte U2OS Bmal1-dLuc hücre hattında, E9 molekülünün sitotoksik etkisini değerlendirdim. Hücreler, 20 µM E9 ile muamele edilerek deney grubu oluşturulmuş; kontrol grubu ise yalnızca %0.4 DMSO içeren ortamla işleme tabi tutulmuştur (bu durum, E9'un 0 µM

konsantrasyonu olarak kabul edilmiştir). Ayrıca, literatürde yüksek toksisiteye sahip olduğu bilinen %5 DMSO pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, 20 µM E9 uygulanan hücrelerdeki canlılık oranı ile kontrol grubundaki hücreler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu bulgu, E9'un bu hücre hattında 20 µM'e kadar olan dozlarda sitotoksik etki göstermediğini ortaya koymuştur (Şekil 4.2). Bu doğrultuda, 20 µM'nin altında kalan 10 µM, 5 µM, 2.5 µM, 1.25 µM ve 0.625 µM konsantrasyonlarının da toksik olmadığı varsayılmış ve bu konsantrasyonlar ilerleyen deneylerde doza bağlı yanıtların incelenmesinde kullanılmıştır.

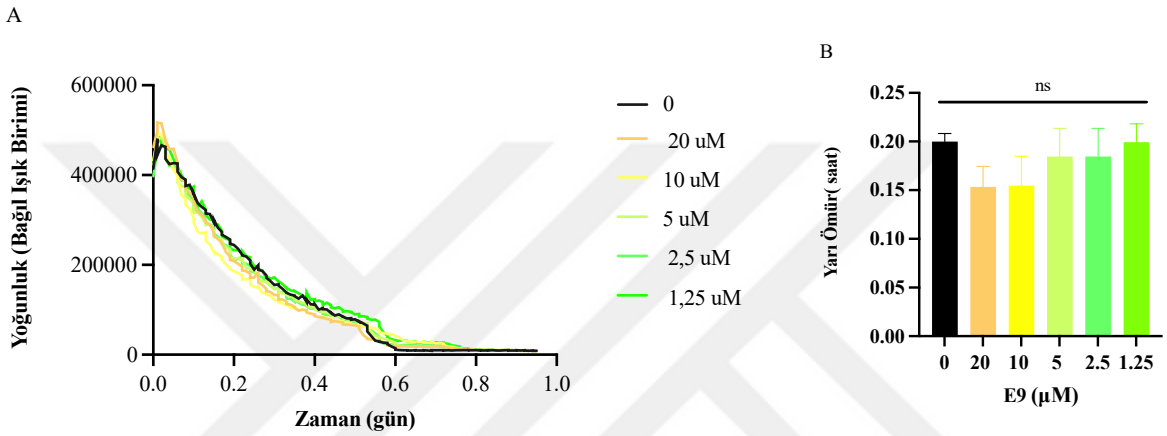


Şekil 4.2: E9'un U2OS *Bmal1-dLuc* hücre hattı üzerindeki toksisite çalışması.

E9 molekülünün hücre canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla U2OS hücre hattında MTT sitotoksisite analizi gerçekleştirilmiştir. Hücre plakaya ekimden 48 saat sonra E9 ile muamele edilmiş ve ardından 48 saatlik bir inkübasyon sürecine bırakılmıştır. Hücre canlılığına ilişkin absorbans ölçümleri Synergy H1 Mikroplaka Okuyucu cihazı kullanılarak alınmıştır. Elde edilen veriler, %0.4 DMSO içeren kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart hata (SEM) şeklinde ifade edilmiş olup, her deney üç tekerrür (n=3) ile yürütülmüştür ****$p < 0.0001$.

4.3. PROTEİN YIKIM (DEGRADASYON) ANALİZİ SONUÇLARI

Bu tezde kullanılan birçok yöntem, lüsiferaz bazlı analizlere dayanmaktadır. Bu nedenle, E9 molekülünün lusiferaz (LUC) enziminin lüminesans özelliklerini doğrudan etkileyip etkilemediğini kontrol etmek amacıyla, E9 molekülünün LUC aktivitesi üzerindeki potansiyel etkisi analiz edilmiştir. Şekil 4.3'te görüldüğü üzere, E9 molekülünün lüsiferaz enzim aktivitesi üzerinde belirgin bir etkisi tespit edilmemiştir.

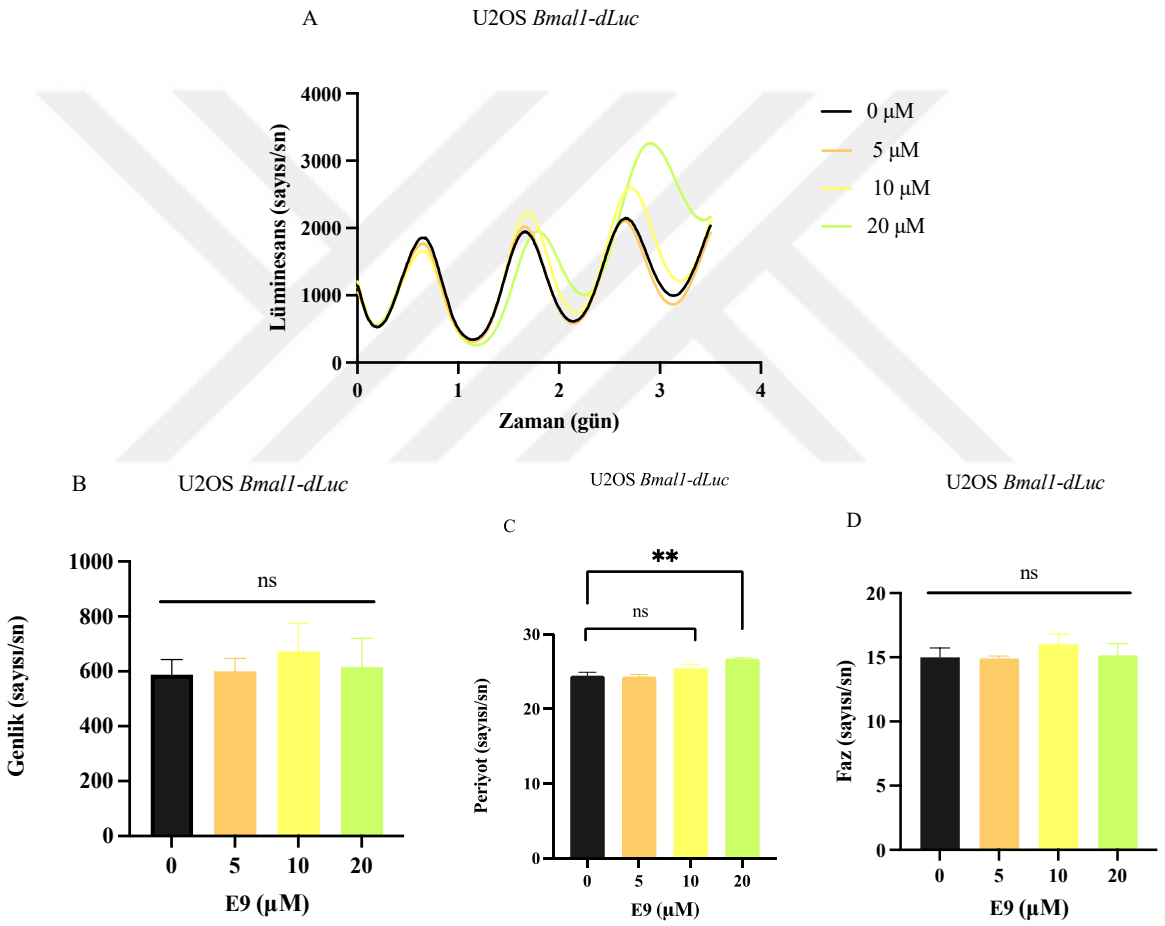


Şekil 4.3: E9 molekülünün lüsiferazın yarı ömrüne etkisinin değerlendirilmesi.

E9 molekülünün lüsiferaz enziminin yarı ömrü üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla HEK 293T hücreleri, pcDNA-Luc plazmidi ile transfekte edilmiştir. Transfeksiyonun ardından hücrelere %0.4 DMSO içeren E9 molekülü uygulanmış ve lüsiferaz sinyali, sinyal şiddeti sabitlenene kadar izlenmiştir. Şekil 4.3.A'da E9 molekülü uygulama sonrası lüsiferaz yarı ömrü üzerindeki etkisinin zamana bağlı olarak değişimi gösterilmiştir. Şekil Şekil 4.3. B'de ise elde edilen verilerin grafiksel olarak sunulan kantitatif analizi yer almaktadır. Elde edilen sonuçlara göre E9 molekülü, lüsiferaz protein yarı ömrü üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Veriler, ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edilmiş olup, deneyler üç bağımsız tekrar (n=3) ile gerçekleştirilmiştir.

4.4. SİRKADİYEN SALINIMLARIN GERÇEK ZAMANLI TAKİBİ

Şekil 4.4'te görüldüğü gibi, U2OS Bmal1-dLuc hücreleri, E9 molekülünün 5 µM ile 20 µM arasındaki konsantrasyonlarıyla muamele edilerek LumiCycle cihazında sirkadiyen ritimleri izlenmiştir. Elde edilen veriler, E9 molekülünün hücrelerin sirkadiyen periyot uzunluğunu 20 µM doza bağımlı olarak uzattığını göstermiştir (Şekil 4.4). Kontrol grubunda (DMSO ile muamele edilen hücreler) periyot uzunluğu ortalama 24 saat olarak belirlenirken, en yüksek doz olan 20 µM'da bu sürenin ortalama 26.70'e saate çıktığı tespit edilmiştir.

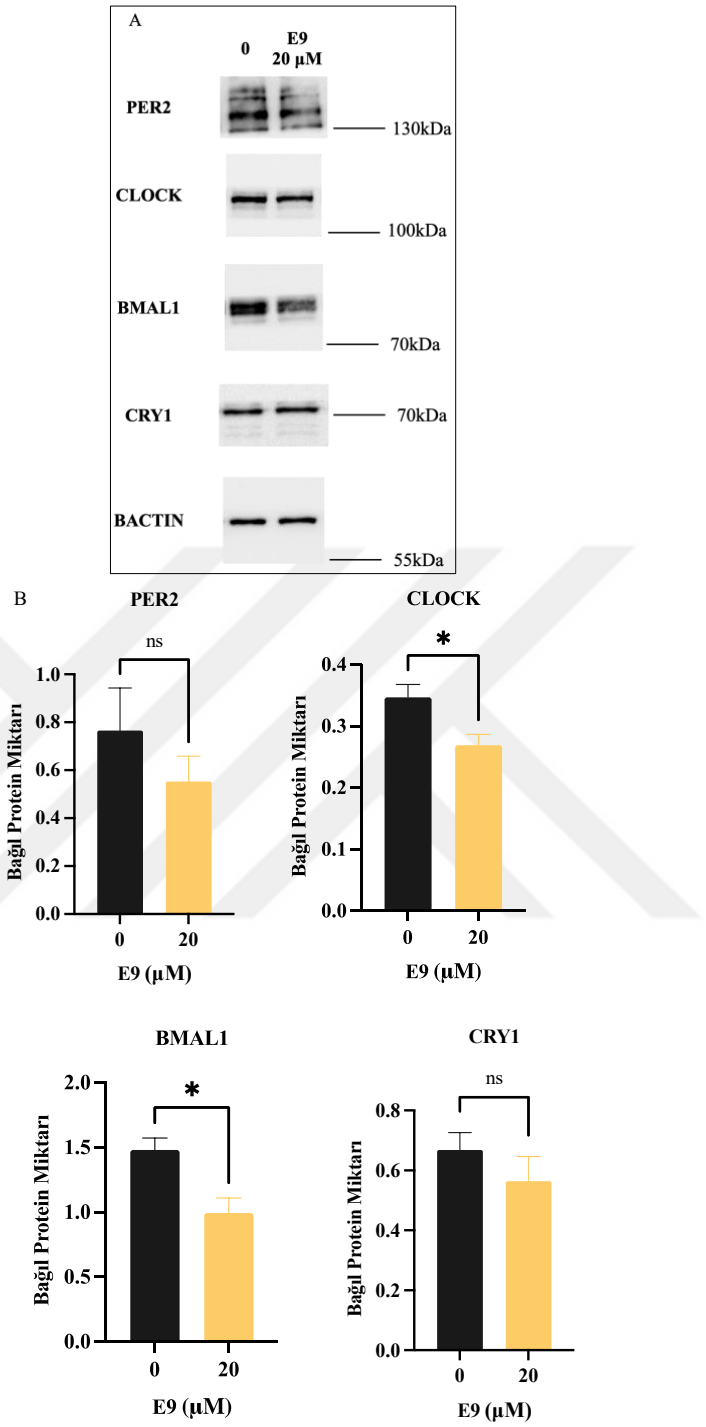


Şekil 4.4: E9 molekülünün 5 µM ile 20 µM arasındaki konsantrasyonlarının U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde sirkadiyen periyot uzunluğuna etkisinin biyolüminesans yöntemiyle değerlendirilmesi. A) Kontrol grubu: %0.4 DMSO ve E9 molekülü uygulanmış U2OS Bmal1-dLuc hücreleri, B) E9 molekülünün U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde genliğe etkisi C) E9 molekülünün U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde sirkadiyen saat periyoduna etkisi. D) E9 molekülünün U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde sirkadiyen saat fazına etkisi.

Şekil 4.4'te görüldüğü gibi U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde, DMSO (nihai konsantrasyon %0.4) ve farklı E9 molekülünün farklı konsantrasyonları (n=3) ile gerçekleştirilen hücre temelli biyolüminesans analizi kapsamında, hücreler LumiCycle (Actimetrics) cihazı kullanılarak 4 gün boyunca sürekli olarak izlenmiştir. Verilerin analizinde, ilk güne ait ölçümler çıkarılarak sirkadiyen ritim dalgalanmaları değerlendirilmiştir. U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde sirkadiyen periyot uzunluğunu 20 μM doza bağlı şekilde artırarak belirgin bir doz-yanıt ilişkisi ortaya koymuştur (Şekil 4.4). Elde edilen bulgular, E9 molekülünün genlik üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermiştir. (Şekil 4.4, B) Elde edilen bulgular, E9 molekülü uygulamasının 20 μM konsantrasyonda analizi yapılan hücrelerin sirkadiyen periyot uzunluğunda anlamlı bir uzamaya neden olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4, C). Elde edilen bulgular, E9 molekülünün sirkadiyen saat fazı üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermiştir (Şekil 4.4, D). Veriler ortalama ± standart hata (SEM) şeklinde sunulmuş olup, istatistiksel anlamlılık değerlendirmesi Student's t-testi ile yapılmıştır. Anlamlılık düzeyleri *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ olarak belirtilmiştir.

4.5. E9 MOLEKÜLÜ UYGULAMASININ SİRKADİYEN SAATİN ÇEKİRDEK PROTEİN BİLEŞENLERİ DÜZEYLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

E9 molekülünün sirkadiyen ritim üzerindeki etkileri değerlendirildikten sonra, bu bileşiğin temel saat proteinleri üzerindeki etkisi Western blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Senkronize edilmemiş U2OS Bmal1-dLuc hücreleri, doz olarak 20 μM E9 molekülü ile muamele edilmiştir. Hücrelerin toplanmasının ardından elde edilen protein ekstraktları SDS-PAGE ile ayrıştırılmış ve Western blot analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar, E9 molekülünün yalnızca BMAL1 ve CLOCK proteinlerinin düzeyini anlamlı şekilde azalttığını, diğer çekirdek saat proteinleri olan CRY1 ve PER2 üzerinde ise belirgin olmayan bir şekilde azalttığını göstermiştir. Bu bulgular, E9 molekülünün sirkadiyen saat mekanizmasında özgül olarak BMAL1 ve CLOCK proteinine etki ettiğini ve diğer çekirdek bileşenleri belirgin olarak etkilemediğini desteklemektedir.

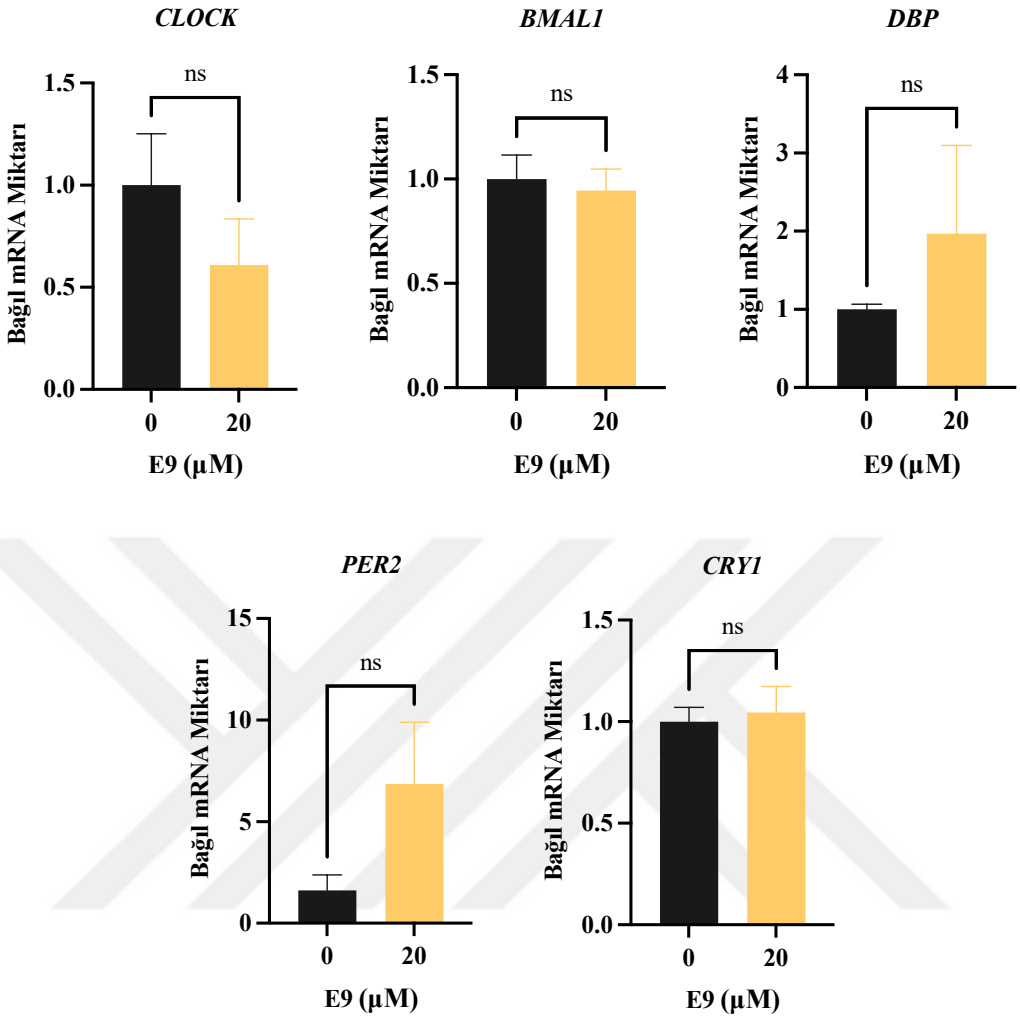


Şekil 4.5: E9 molekülünün (20 µM) senkronize olmayan U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde temel saat proteinleri üzerindeki etkisinin Western blot yöntemiyle değerlendirme sonuçları. A) Western blot analizine ait görseller (ChemiDoc Touch Imaging System, BioRad), B) E9 molekülünün PER2, CLOCK, BMAL1 ve CRY1 endojen protein düzeylerine etkisi.

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi E9 bileşiğinin, senkronize edilmemiş U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde PER2, CLOCK, BMAL1 ve CRY1 endojen proteinleri düzeyleri üzerindeki etkisi Western blot analizi ile değerlendirilmiş ve analize ait görseller ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad) kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 4.5, A). 20 μM konsantrasyondaki E9 molekülü uygulamasından sonra endojen protein düzeylerinin kantitatif analizine göre, E9 molekülünün senkronize olmayan U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde BMAL1 ve CLOCK protein ekspresyonunu 20 μM doza bağımlı olarak anlamlı biçimde azalttığını, buna karşılık diğer çekirdek saat proteinlerinin (PER2 ve CRY1) belirgin olmayan bir şekilde azalttığını göstermiştir. Veriler ortalama ± standart hata (SEM) şeklinde sunulmuş olup (n=3), istatistiksel analiz Student's t-testi ile yapılmıştır. *$p < 0.05$ düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.

4.6. E9 MOLEKÜLÜ UYGULAMASININ ÇEKİRDEK SAAT GENLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNE ETKİSİ

E9 molekülünün BMAL1 ve CLOCK proteinleri düzeyleri etkilemesi durumunda, saat tarafından kontrol edilen genlerin transkripsiyon düzeylerinde de değişiklik olması beklenmektedir. Bu hipotezi değerlendirmek amacıyla, U2OS Bmal1-dLuc hücreleri E9'un toksisite göstermeyen en yüksek konsantrasyonu olan 20 μM ile muamele edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, saat kontrollü çıktı genlerinden PER2 ve DBP'nin ekspresyon düzeylerinde anlamlı olmayan bir artma tespit edilmiştir. Buna karşın, CLOCK proteininde anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiş ve diğer genlerin transkripsiyonel aktivitelerinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir.

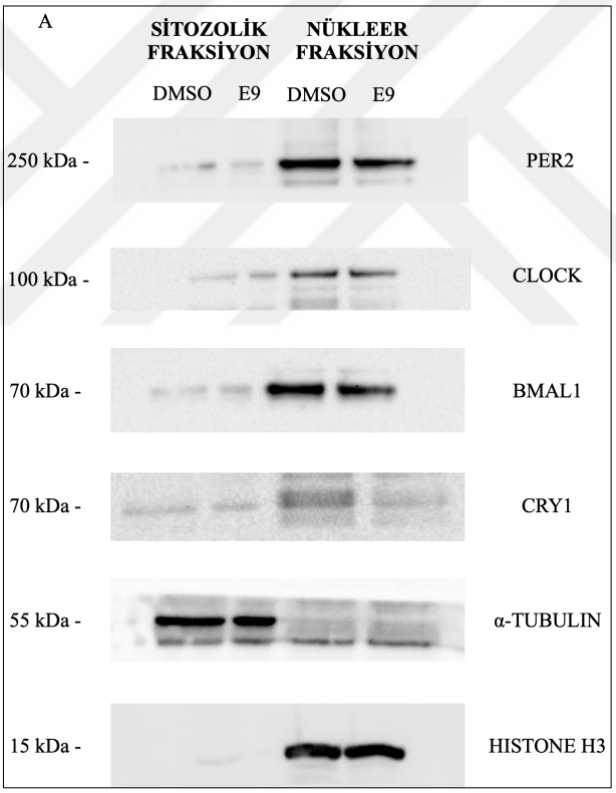


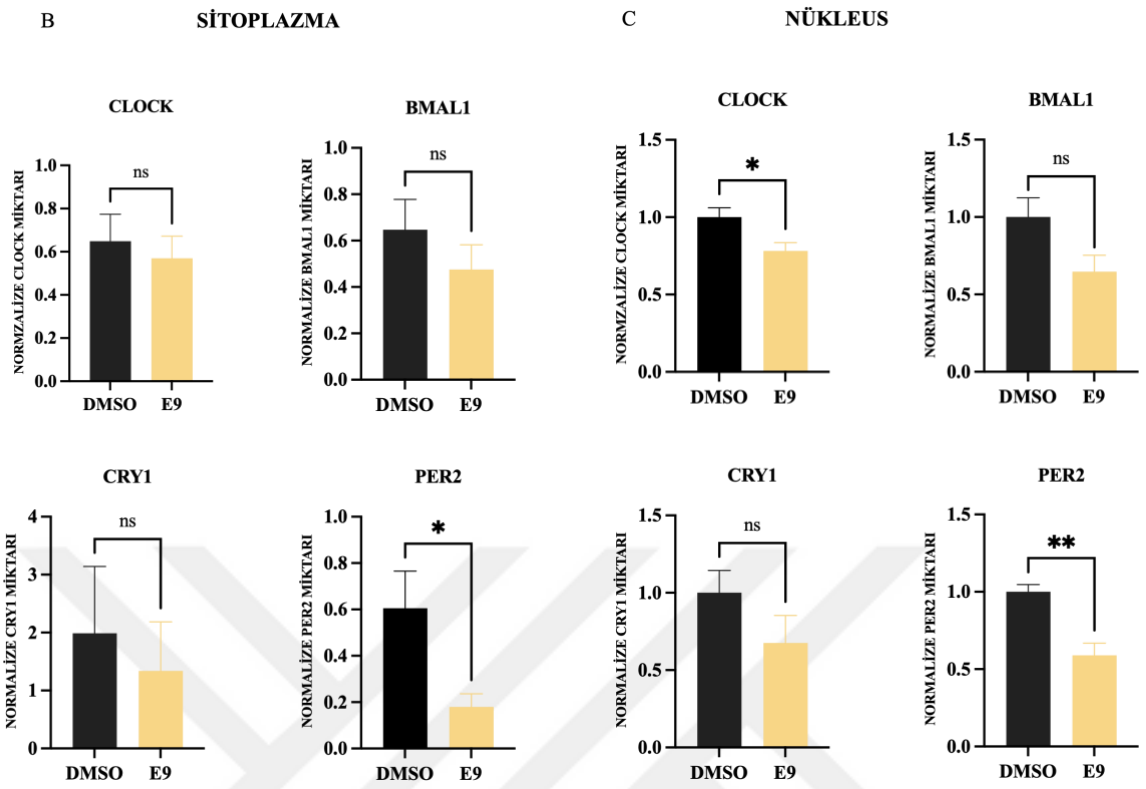
Şekil 4.6: E9 molekülü uygulamasının çekirdek saat genlerinin ifade düzeylerine etkisinin değerlendirilmesi.

Senkronize edilmemiş ve tam konfluente ulaşmış U2OS Bmal1-dLuc hücrelerine E9 molekülü 20 µM konsantrasyonunda uygulanmıştır. Uygulama sonrası gen ekspresyon düzeyleri, her örnekte referans gen olarak kullanılan RPLP0 mRNA seviyelerine göre normalize edilerek 2^−ΔΔCt yöntemiyle RT-qPCR analizi aracılığıyla belirlenmiştir. Elde edilen veriler ortalama ± standart hata (SEM) şeklinde sunulmuş olup, n=3'tür. Anlamlılık analizleri için Student's t-testi kullanılmıştır. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi E9 molekülünün, DBP ve PER2 mRNA düzeylerini artırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.6).

4.7. E9 MOLEKÜLÜNÜN ÇEKİRDEK SAAT PROTEİNLERİNİN HÜCRE ALTI LOKALİZASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

E9'un çekirdek saat proteinlerinin hücre içi dağılımı üzerinde etkili olup olmadığını incelemek amacıyla, senkronize edilmemiş U2OS hücrelerinde subselüler fraksiyonlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Fraksiyonlama sonrasında örneklerin kalitesi, sitoplazmik ve nükleer fraksiyonların sırasıyla anti-TUBULIN ve anti-HISTONE H3 antikorları ile taranması yoluyla doğrulanmıştır. Temiz fraksiyonların elde edilmesinin ardından, temel saat proteinlerinin sitozol ve çekirdek içindeki düzeyleri değerlendirilmiştir.



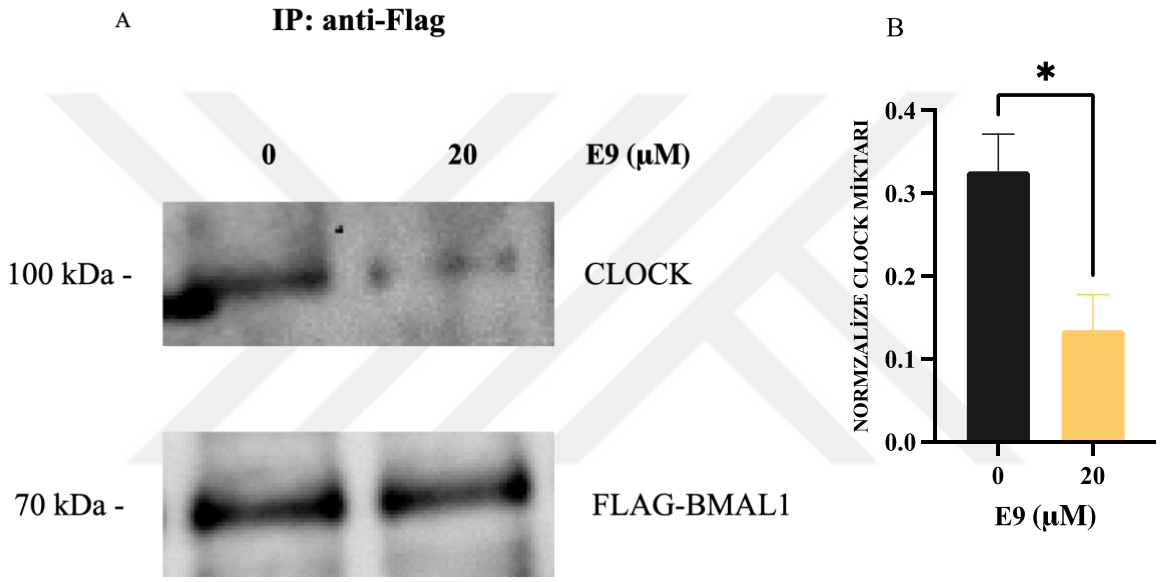


Şekil 4.7: E9 molekülünün çekirdek saat proteinlerinin hücre altı lokalizasyonu üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi. A) sitozolik ve nükleer fraksiyon Western blot analizine ait görseller (ChemiDoc Touch Imaging System, BioRad), B) sitoplazmadaki temel saat proteinlerinin kantitatif analizi, C) nükleus temel saat proteinlerinin kantitatif analizi.

Senkronize edilmemiş U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde 20 µM E9 (nihai DMSO konsantrasyonu %0.4) uygulamasının ardından subselüler fraksiyonlama gerçekleştirilmiş, CLOCK, BMAL1, CRY1 ve PER2 protein düzeyleri Western Blot yöntemiyle analiz edilmiştir. E9 molekülü uygulaması sonrası sitoplazmadaki temel saat proteinlerinin kantitatif analizi yapılmıştır. Protein seviyeleri, çekirdek için HISTONE H3'e ve sitoplazma için α-TUBULIN'e normalize edilmiştir. Veriler, üç bağımsız deneyin (n=3) ortalaması ± standart hata (SEM) olarak sunulmuştur. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi, E9 molekülü uygulaması ile CLOCK ve PER2 proteinlerinin nükleer düzeyde anlamlı ölçüde azaldığı, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber sitoplazmik düzeylerinde de azaldığı belirlenmiştir. Bununla beraber BMAL1 ve CRY1 proteinlerinde de hem nükleer düzeyde hem de sitoplazmik düzeyde anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiştir.

4.8. E9 MOLEKÜLÜ VARLIĞINDA KO-İMMUNOPRESİPİTASYON (CO-IP)

E9 molekülünün CLOCK ile BMAL1 proteinleri arasındaki etkileşimi değerlendirmek üzere Ko-immunopresipitasyon (Co-IP) deneyi gerçekleştirilmiştir. FLAG etiketi taşıyan BMAL1 ve CLOCK içeren plazmidler HEK 293T hücrelerine transfekte edilmiştir. Hücre lizatı hazırlandıktan sonra, anti-FLAG reçinesi kullanılarak FLAG-BMAL1 proteinleri çöktürülmüştür. Ardından, Western blot yöntemiyle çöktürülen örneklerdeki CLOCK protein miktarı kantifiye edilmiştir.



Şekil 4.8: E9 molekülü varlığında ko-immunopresipitasyon (Co-IP) deneyi ile CLOCK ile BMAL1 proteinleri arasındaki etkileşimin değerlendirilmesi. A) E9 molekülü varlığında CLOCK-BMAL1 etkileşim düzeylerinin Western Blot analizine ait görseller, B) E9 molekülü varlığında CLOCK-BMAL1 etkileşim düzeylerinin kantitatif analiz sonuçları.

E9'un varlığında CLOCK:BMAL1 etkileşim düzeyleri Ko-immunopresipitasyon (Co-IP) yöntemiyle incelenmiştir. FLAG etiketi taşıyan BMAL1, anti-FLAG reçinesi kullanılarak çöktürülmüş ve beraberinde çöktürülen CLOCK protein miktarı Western blot ile analiz edilmiştir. E9 molekülü uygulaması sonrası CLOCK:BMAL1 etkileşim miktarlarının grafiksel gösterimi yapılmıştır. CLOCK protein seviyeleri, FLAG-BMAL1 miktarlarına göre normalize edilmiştir. Veriler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir (n=3). *$p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılık belirtilmiştir. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi E9 molekülü varlığında FLAG etiketi taşıyan BMAL1 protein düzeyinin sabit kaldığı; E9 molekülünün CLOCK protein

seviyelerini anlamlı şekilde azalttığı ve molekülün CLOCK ve BMAL1 arasındaki etkileşimi azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.8).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çekirdek saat proteinlerine yönelik küçük moleküllerin keşfi, sirkadiyen ritim araştırmaları açısından büyük öneme sahiptir. Bu moleküller, hücresel düzeyde sirkadiyen düzenin daha iyi anlaşılmasını sağlarken, ritim bozukluklarına bağlı hastalıkların tedavisi için de yeni yaklaşımlar sunabilir. Bu doğrultuda, sirkadiyen saati etkileyebilecek moleküllerin geliştirilmesine yönelik çeşitli çalışmalar yürütülmektedir (Chen vd., 2018; Hirota & Kay, 2015). Şimdiye dek yapılan araştırmalar, genellikle REV-ERB ve Casein kinase Iε gibi yardımcı saat proteinlerini hedef alan bileşiklerin geliştirilmesini sağlamıştır (Chen vd., 2018). Ancak, doğrudan çekirdek saat proteinlerini hedefleyen molekül sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, hücresel düzeyde sirkadiyen ritmin periyod uzunluğunu etkileyebilecek potansiyel küçük moleküllerin belirlenmesi ve mekanistik düzeyde karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, daha önce Halil Kavaklı ve ekibi tarafından in silico yaklaşımla tanımlanan E9 adlı molekülün, CLOCK proteinine etkisi çok yönlü deneysel analizlerle incelenmiştir.

Öncelikle, E9 molekülünün sitotoksik etkileri değerlendirilmiş ve belirlenen dozlarda hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir toksik etki oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, E9'un sirkadiyen ritim üzerine etkilerinin hücre ölümüne bağlı olmaktan ziyade özgül biyokimyasal mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştiğini düşündürmektedir. Gerçek zamanlı biyolüminesans takibi sonucunda, E9 molekülünün toksik olmayan dozlarda sirkadiyen periyodu anlamlı şekilde uzattığını göstermiştir. Bu bulgu, E9 molekülünün bir periyot değiştirici (period changer) molekül olarak işlev gördüğünü ortaya koymaktadır. Periyot uzamasının moleküler temellerinden birinin bu proteinlerin ekspresyon düzeyindeki azalma olabileceğini göstermektedir. Kullanılan stabil reporterlara sahip hücre modelleri sayesinde, bu etkinin dışsal sinyallere değil, doğrudan hücre içi saat mekanizmasına bağlı olduğu gösterilmiştir.

Moleküler düzeyde mekanizmayı anlamak amacıyla protein ve gen ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Western blot analizleri, CLOCK ve BMAL1 protein düzeylerinde azalma olduğunu göstermiştir. Bu farklılık, muhtemelen CLOCK proteininin translasyon sonrası modifikasyonları ya da stabilitesinde meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca CLOCK proteininin fonksiyon gösterebilmesi için çekirdeğe taşınması gerektiğinden, bu süreçte bir aksama olup olmadığını araştırmak amacıyla subselüler lokalizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, E9 molekülünün BMAL1 ve CLOCK'un nükleer

düzeydeki lokalizasyonunu değiştirmesi ve CLOCK:BMAL1 etkileşimini zayıflatması, bu kompleksin transkripsiyonel aktivitesinin doğrudan etkilendiğini göstermektedir. Bu durum, PER ve CRY genlerinin dolaylı olarak etkilenmesine yol açabilir ve geri besleme döngüsünde bir sapmaya neden olabilir. Ayrıca RT-qPCR verileri, PER2 ve DBP genlerinin mRNA düzeylerinde bir artış olduğunu göstermiştir. Bu artış, E9 molekülünün saat genlerinin transkripsiyonunu dolaylı olarak yeniden programladığını göstermektedir.

Bu da, CLOCK-BMAL1 heterodimerizasyonunu zayıflattığı ve böylece CLOCK'un çekirdek lokalizasyonunu engellediği düşünülmektedir. Gerçekleştirilen Co-immunoprecipitation (Co-IP) deneyleri de CLOCK-BMAL1 etkileşiminde azalma olduğunu doğrulamıştır. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, E9 molekülünün sirkadiyen saat üzerinde periyot uzatıcı etkisinin, CLOCK proteinine bağlanarak bu proteinin BMAL1 ile etkileşimini ve çekirdeğe geçişini engellemesi yoluyla gerçekleştiği ileri sürülebilir.

Bununla birlikte, periyot değişiminin hangi moleküler adım aracılığıyla gerçekleştiği hâlâ tam olarak anlaşılamamıştır. CLOCK-BMAL1 kompleksinin hedef gen promotörlerine bağlanma kapasitesinde bir değişiklik olup olmadığını belirlemek üzere Kromatin İmmünopresipitasyonu (ChIP-qPCR), Proteazom İnhibisyon Testi (MG132 tedavisi) ve Ubiquitinasyon Testi gibi ileri deneysel yaklaşımların uygulanması gerekmektedir. Bu tür analizler, CLOCK'un transkripsiyonel etkinliğine doğrudan etki edip etmediğini ortaya koymak açısından büyük önem taşımaktadır.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında, sirkadiyen saat regülasyonunda merkezi bir rol oynayan CLOCK proteinine doğrudan bağlanan E9 molekülünün biyolojik etkileri detaylı bir şekilde incelenmiştir. Yapılan biyolüminesans analizleri, E9 molekülünün sirkadiyen periyodu anlamlı ölçüde uzattığını göstermiştir. Western blot ve qPCR verileri, protein düzeylerinde azalma ve bazı proteinlerin mRNA seviyelerinde artış olduğunu ortaya koymuş, bu da translasyon sonrası düzenlemelere veya protein lokalizasyonunda değişime işaret etmiştir. Subselüler fraksiyonlama analizleri, CLOCK'un çekirdeğe girişinde azalma olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Co-IP deneyleri E9 molekülünün CLOCK-BMAL1 proteinleri etkileşimini azalttığını doğrulamıştır.

Bu sonuçlar, E9 molekülünün doğrudan CLOCK proteinine bağlanarak onun BMAL1 ile etkileşimini zayıflattığını, bu sayede CLOCK'un çekirdek lokalizasyonunu ve dolayısıyla

transkripsiyonel aktivitesini bozduğunu ortaya koymaktadır. Böylelikle, periyot uzatıcı etkinin moleküler düzeydeki ilk adımları tanımlanmıştır. Ancak, bu etkinin transkripsiyon hedeflerine nasıl yansıdığı henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bunu açıklamak için ileri deneylerin yapılması, bu mekanizmanın netleştirilmesi açısından gereklidir. Bu çalışma, sirkadiyen ritim üzerinde etkili yeni moleküllerin tanımlanmasında CLOCK proteinini doğrudan hedef almanın potansiyelini ortaya koymakta ve gelecekteki terapötik yaklaşımlara ışık tutmaktadır.

KAYNAKLAR

Abdalla, O. H. M. H., Mascarenhas, B., & Cheng, H.-Y. M. (2022). Death of a Protein: The Role of E3 Ubiquitin Ligases in Circadian Rhythms of Mice and Flies. International Journal of Molecular Sciences, 23(18), 10569. https://doi.org/10.3390/ijms231810569.

Anna, G., & Kannan, N. N. (2021). Post-transcriptional modulators and mediators of the circadian clock. Chronobiology International, 38(9), 1244-1261. https://doi.org/10.1080/07420528.2021.1928159.

Astiz, M., Heyde, I., & Oster, H. (2019). Mechanisms of communication in the Mammalian Circadian timing system. International Journal of Molecular Sciences (C. 20, Sayı 2). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms20020343.

Baser, K. H. C., Haskologlu, I. C., & Erdag, E. (2025). Molecular Links Between Circadian Rhythm Disruption, Melatonin, and Neurodegenerative Diseases: An Updated Review. Molecules, 30(9), 1888. https://doi.org/10.3390/molecules30091888.

Battaglin, F., Chan, P., Pan, Y., Soni, S., Qu, M., Spiller, E. R., Castanon, S., Roussos Torres, E. T., Mumenthaler, S. M., Kay, S. A., & Lenz, H.-J. (2021). Clocking cancer: the circadian clock as a target in cancer therapy. Oncogene, 40(18), 3187-3200. https://doi.org/10.1038/s41388-021- 01778-6.

Besing, R. C., Paul, J. R., Hablitz, L. M., Rogers, C. O., Johnson, R. L., Young, M. E., & Gamble, K. L. (2015). Circadian Rhythmicity of Active GSK3 Isoforms Modulates Molecular Clock Gene Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus. Journal of Biological Rhythms, 30(2), 155-160. https://doi.org/10.1177/0748730415573167.

Buttgereit, F., Smolen, J. S., Coogan, A. N., & Cajochen, C. (2015). Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. Nature Reviews Rheumatology, 11(6), 349-356. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.31.

Cha, J., Yuan, H., & Liu, Y. (2011). Regulation of the Activity and Cellular Localization of the Circadian Clock Protein FRQ*. Journal of Biological Chemistry, 286(13), 11469-11478. https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M111.219782.

Chaix, A., Zarrinpar, A., & Panda, S. (2016). The circadian coordination of cell biology. Journal of Cell Biology (C. 215, Sayı 1). Rockefeller University Press. https://doi.org/10.1083/jcb.201603076

Chen, Z., Yoo, S.-H., & Takahashi, J. S. (2018). Development and Therapeutic Potential of Small-Molecule Modulators of Circadian Systems. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 58(1), 231-252. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052645.

Couchie, D., Medali, T., Diderot, V., Raymondjean, M., Friguet, B., & Rouis, M. (2022). Circadian rhythmicity of the thioredoxin system in cultured murine peritoneal macrophages. Biochimie, 198, 76-85. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.03.006.

Crislip, G. R., Johnston, J. G., Douma, L. G., Costello, H. M., Juffre, A., Boyd, K., Li, W., Maugans, C. C., Gutierrez-Monreal, M., Esser, K. A., Bryant, A. J., Liu, A. C., & Gumz, M. L. (2021). Circadian Rhythm Effects on the Molecular Regulation of Physiological Systems. Comprehensive Physiology (ss. 2769-2798). Wiley. https://doi.org/10.1002/cphy.c210011.

Crosthwaite, S. K., Dunlap, J. C., & Loros, J. J. (1997). Neurospora wc-1 and wc-2: Transcription, Photoresponses, and the Origins of Circadian Rhythmicity. Içinde New Series (C. 276, Sayı 5313).de Assis, L. V. M., & Oster, H. (2021). The circadian clock and metabolic homeostasis: entangled networks. Cellular and Molecular Life Sciences, 78(10), 4563-4587. https://doi.org/10.1007/s00018-021-03800-2

Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. (2009). The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. Annual Review of Physiology (C. 72, ss. 517-549). https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135821.

Diernfellner, A., Colot, H. V, Dintsis, O., Loros, J. J., Dunlap, J. C., & Brunner, M. (2007). Long and short isoforms of Neurospora clock protein FRQ support temperature-compensated circadian rhythms. FEBS Letters, 581(30), 5759-5764. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.043.

Ding, M., Zhou, H., Li, Y.-M., & Zheng, Y.-W. (2024). Molecular Pathways Regulating Circadian Rhythm and Associated Diseases. Frontiers in Bioscience-Landmark, 29(6). https://doi.org/10.31083/j.fbl2906206.

Ding, Z., Doyle, M. R., Amasino, R. M., & Davis, S. J. (2007). A complex genetic interaction between Arabidopsis thaliana TOC1 and CCA1/LHY in driving the circadian clock and in output regulation. Genetics, 176(3), 1501-1510. https://doi.org/10.1534/genetics.107.072769.

Doi, M., Hirayama, J., & Sassone-Corsi, P. (2006). Circadian Regulator CLOCK Is a Histone Acetyltransferase. Cell, 125(3), 497-508. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.033.

Doruk, Y. U., Yarparvar, D., Akyel, Y. K., Gul, S., Taskin, A. C., Yilmaz, F., Baris, I., Ozturk, N., Türkay, M., Ozturk, N., Okyar, A., & Kavakli, I. H. (2020). A CLOCK-binding small molecule disrupts the interaction between CLOCK and BMAL1 and enhances circadian rhythm amplitude. Journal of Biological Chemistry, 295(11), 3518-3531. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011332.

Eckel-Mahan, K., & Sassone-Corsi, P. (2015). Phenotyping Circadian Rhythms in Mice. Current protocols in mouse biology, 5(3), 271-281. https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo140229.

Eng, G. W. L., Edison, & Virshup, D. M. (2017). Site-specific phosphorylation of casein kinase 1 δ (CK1δ) regulates its activity towards the circadian regulator PER2. PLOS ONE, 12(5), e0177834. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177834.

Fagiani, F., Di Marino, D., Romagnoli, A., Travelli, C., Voltan, D., Di Cesare Mannelli, L., Racchi, M., Govoni, S., & Lanni, C. (2022). Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases. Signal Transduction and Targeted Therapy, 7(1), 41. https://doi.org/10.1038/s41392-022-00899-y.

Fuyi, Y. (2024). Biological Rhythms. Içinde Z. Kan (Ed.), The ECPH Encyclopedia of Psychology (ss. 147-148). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-97-7874-4_895.

Galinde, A. AS., Al-Mughales, F., Oster, H., & Heyde, I. (2023). Different levels of circadian (de)synchrony – where does it hurt? F1000Research, 11, 1323. https://doi.org/10.12688/f1000research.127234.2.

Gallego, M., & Virshup, D. M. (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8(2), 139-148. https://doi.org/10.1038/nrm2106.

Goldbeter, A. (2008). Biological rhythms: Clocks for all times. Current Biology, 18(17), R751-R753. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.044.

Grobbelaar, N., Huang, T. C., Lin, H. Y., & Chow, T. J. (1986). Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* RF-1. FEMS Microbiology Letters, 37(2), 173-177. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01788.x.

Gu, X., Xing, L., Shi, G., Liu, Z., Wang, X., Qu, Z., Wu, X., Dong, Z., Gao, X., Liu, G., Yang, L., & Xu, Y. (2012). The circadian mutation PER2S662G is linked to cell cycle progression and tumorigenesis. Cell Death & Differentiation, 19(3), 397-405. https://doi.org/10.1038/cdd.2011.103.

Gul, S., Akyel, Y. K., Gul, Z. M., Isin, S., Ozcan, O., Korkmaz, T., Selvi, S., Danis, I., Ipek, O. S., Aygenli, F., Taskin, A. C., Akarlar, B. A., Ozlu, N., Ozturk, N., Ozturk, N., Ünal, D. Ö., Guzel, M., Turkay, M., Okyar, A., & Kavakli, I. H. (2022). Discovery of a small molecule that selectively destabilizes Cryptochrome 1 and enhances life span in p53 knockout mice. Nature Communications, 13(1), 6742. https://doi.org/10.1038/s41467-022-34582-1.

Gul, S., & Kavakli, I. H. (2022). The Structure-Based Molecular-Docking Screen Against Core Clock Proteins to Identify Small Molecules to Modulate the Circadian Clock (ss. 15-34). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2249-0_2.

Gul, S., Rahim, F., Isin, S., Yilmaz, F., Ozturk, N., Turkay, M., & Kavakli, I. H. (2021). Structure- based design and classifications of small molecules regulating the circadian rhythm period. Scientific Reports, 11(1), 18510. https://doi.org/10.1038/s41598-021-97962-5.

Hastings, M., Maywood, E., & Brancaccio, M. (2019). The Mammalian Circadian Timing System and the Suprachiasmatic Nucleus as Its Pacemaker. Biology, 8(1), 13. https://doi.org/10.3390/biology8010013.

Helm, B., & Lincoln, G. (2017). Circannual Rhythms Anticipate the Earth's Annual Periodicity.

Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour (ss. 545-569). https://doi.org/10.1007/978-81-322-3688-7_26.

Herzog, E. D., Hermanstyne, T., Smyllie, N. J., & Hastings, M. H. (2017). Regulating the suprachiasmatic nucleus (SCN) circadian clockwork: Interplay between cell- autonomous and circuit-level mechanisms. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 9(1). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027706.

Hirano, A., Yumimoto, K., Tsunematsu, R., Matsumoto, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nakagawa, T., Lanjakornsiripan, D., Nakayama, K. I., & Fukada, Y. (2013). FBXL21 Regulates Oscillation of the Circadian Clock through Ubiquitination and Stabilization of Cryptochromes. Cell, 152(5), 1106-1118. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.054.

Hirayama, J., & Sassone-Corsi, P. (2005). Structural and functional features of transcription factors controlling the circadian clock. Current Opinion in Genetics & Development, 15(5), 548-556. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.07.003.

Hirayama, J., & Sassone-Corsi, P. (2009). Transcription Control and the Circadian Clock. Içinde L. R. Squire (Ed.), Encyclopedia of Neuroscience (ss. 1071-1080). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00194-7.

Hirota, T., & Kay, S. A. (2015). Chapter Thirteen - Identification of Small-Molecule Modulators of the Circadian Clock. Içinde A. Sehgal (Ed.), Methods in Enzymology (C. 551, ss. 267-282). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.10.015.

Hirota, T., Lee, J. W., St. John, P. C., Sawa, M., Iwaisako, K., Noguchi, T., Pongsawakul, P. Y., Sonntag, T., Welsh, D. K., Brenner, D. A., Doyle, F. J., Schultz, P. G., & Kay, S. A. (2012). Identification of Small Molecule Activators of Cryptochrome. Science, 337(6098), 1094-1097. https://doi.org/10.1126/science.1223710.

Honma, S. (2018). The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm. The Journal of Physiological Sciences, 68(3), 207-219. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12576-018-0597-5.

Huang, N., Chelliah, Y., Shan, Y., Taylor, C. A., Yoo, S.-H., Partch, C., Green, C. B., Zhang, H., &Takahashi, J. S. (2012a). Crystal Structure of the Heterodimeric CLOCK:BMAL1 Transcriptional Activator Complex. Science, 337(6091), 189-194. https://doi.org/10.1126/science.1222804.

Huang, T.-C., & Chou, M. (1991). Setting of the Circadian N2-Fixing Rhythm of the Prokaryotic *Synechococcus* sp. RF-1 while Its nif Gene Is Repressed1. Plant Physiol (C. 96). https://academic.oup.com/plphys/article/96/1/324/6086707.

Hunter, A. L., & Bechtold, D. A. (2025). The metabolic significance of peripheral tissue clocks. Communications Biology (8, 1). Nature Research. https://doi.org/10.1038/s42003-025-07932-0.

Husse, J., Eichele, G., & Oster, H. (2015). Synchronization of the mammalian circadian timing system: Light can control peripheral clocks independently of the SCN clock. BioEssays, 37(10), 1119-1128. https://doi.org/10.1002/bies.201500026.

Inoue, K., Araki, T., & Endo, M. (2017). Integration of input signals into the gene network in the plant circadian clock. Plant and Cell Physiology (58, 6, 977-982). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/pcp/pcx066.

Jabbur, M. L., & Johnson, C. H. (2022). Spectres of Clock Evolution: Past, Present, and yet to Come. Frontiers in Physiology (12). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.815847.

Jiao, H., Kalsbeek, A., & Yi, C.-X. (2024). Microglia, circadian rhythm and lifestyle factors.Neuropharmacology, 257, 110029. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2024.110029.

Johnson, C. H., Mori, T., & Xu, Y. (2008). A Cyanobacterial Circadian Clockwork. Current Biology (C. 18, Sayı 17). https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.012.

Johnson, C. H., Stewart, P. L., & Egli, M. (2011). The cyanobacterial circadian system: From biophysics to bioevolution. Annual Review of Biophysics, 40(1), 143-167. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155317.

Jouffe, C., Weger, B. D., Martin, E., Atger, F., Weger, M., Gobet, C., Ramnath, D., Charpagne, A., Morin-Rivron, D., Powell, E. E., Sweet, M. J., Masoodi, M., Uhlenhaut, N. H., & Gachon, F. (2022). Disruption of the circadian clock component BMAL1 elicits an endocrine adaption impacting on insulin sensitivity and liver disease. Proceedings of the National Academy of Sciences, 119(10). https://doi.org/10.1073/pnas.2200083119.

Kao, K. , L. J. , S. H. , K. J. , L. J. , N. V. , W. L. , G. S. S. , G. M. , & S. B. (2016). Introduction to chronobiology. https://bioclock.ucsd.edu/portfolio-item/an-introduction-to-chronobiology/.

Kavakli, I. H. (2002). Circadian Photoreception in Humans and Mice. Molecular Interventions, 2(8), 484-492. https://doi.org/10.1124/mi.2.8.484.

Kavakli, I. H., Ozturk, N., & Baris, I. (2022). Chapter Six - Protein interaction networks of the mammalian core clock proteins. R. Donev (Ed.), Protein Interaction Networks (131, 207-233). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2022.04.001.

Keshvari, M., Nejadtaghi, M., Hosseini-Beheshti, F., Rastqar, A., & Patel, N. (2020). Exploring the role of circadian clock gene and association with cancer pathophysiology. Chronobiology International (37, 2, 151-175). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/07420528.2019.1681440.

Kim, E. Y., Jeong, E. H., Park, S., Jeong, H.-J., Edery, I., & Cho, J. W. (2012). A role for O -GlcNAcylation in setting circadian clock speed. Genes & Development, 26(5), 490-502. https://doi.org/10.1101/gad.182378.111.

Kim, E., Yoo, S.-H., & Chen, Z. (2022). Circadian stabilization loop: the regulatory hub and therapeutic target promoting circadian resilience and physiological health. F1000 Research, 11, 1236. https://doi.org/10.12688/f1000research.126364.1.

Kuhlman, S. J., Craig, L. M., & Duffy, J. F. (2018). Introduction to chronobiology. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 10(9). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033613.

Laothamatas, I., Rasmussen, E. S., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2023). Metabolic and chemical architecture of the mammalian circadian clock. Içinde Cell Chemical Biology (30, 9,1033-1052). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2023.08.014.

Lee, C., Etchegaray, J.-P., Cagampang, F. R. A., Loudon, A. S. I., & Reppert, S. M. (2001). Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock. Cell, 107(7), 855-867. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00610-9.

Lee, J., Lee, Y., Lee, M. J., Park, E., Kang, S. H., Chung, C. H., Lee, K. H., & Kim, K. (2008). Dual Modification of BMAL1 by SUMO2/3 and Ubiquitin Promotes Circadian Activation of the CLOCK/BMAL1 Complex. Molecular and Cellular Biology, 28(19), 6056-6065. https://doi.org/10.1128/MCB.00583-08

Lee, Y., Chun, S. K., & Kim, K. (2015). Sumoylation controls CLOCK-BMAL1-mediated clock resetting via CBP recruitment in nuclear transcriptional foci. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1853(10, Part A), 2697-2708. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.005.

Lee, Y., Field, J. M., & Sehgal, A. (2021). Circadian Rhythms, Disease and Chronotherapy. Journal of Biological Rhythms, 36(6), 503-531. https://doi.org/10.1177/07487304211044301.

Liu, N., & Zhang, E. E. (2016). Phosphorylation Regulating the Ratio of Intracellular CRY1 Protein Determines the Circadian Period. Frontiers in Neurology, 7. https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00159.

Lopez, L., Fasano, C., Perrella, G., & Facella, P. (2021). Cryptochromes and the circadian clock: The story of a very complex relationship in a spinningworld. Genes, 12(5). https://doi.org/10.3390/genes12050672.

Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2025). Genetic and Molecular Analysis of Circadian rhythms in neurospora. www.annualreviews.org.

Lowrey, P. L., & Takahashi, J. S. (2011). Chapter 6 - Genetics of Circadian Rhythms in Mammalian Model Organisms. Içinde S. Brody (Ed.), Advances in Genetics (74, 175-230). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387690-4.00006-4.

Masuda, K., Kon, N., Iizuka, K., Fukada, Y., Sakurai, T., & Hirano, A. (2023). Singularity response reveals entrainment properties in mammalian circadian clock. Nature Communications, 14(1), 2819. https://doi.org/10.1038/s41467-023-38392-x.

Meléndez-Fernández, O. H., Liu, J. A., & Nelson, R. J. (2023). Circadian Rhythms Disrupted by Light at Night and Mistimed Food Intake Alter Hormonal Rhythms and Metabolism. International Journal of Molecular Sciences, 24(4), 3392. https://doi.org/10.3390/ijms24043392.

Merbitz-Zahradnik, T., & Wolf, E. (2015). How is the inner circadian clock controlled by interactive clock proteins?: Structural analysis of clock proteins elucidates their physiological role. FEBS Letters, 589(14), 1516-1529. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.024.

Merrow, M., Roenneberg, T., Macino, G., & Franchi, L. (2001). A fungus among us: The Neurospora crassa circadian system. Seminars in Cell and Developmental Biology, 12(4), 279-285. https://doi.org/10.1006/scdb.2001.0255.

Mihut, A., O'Neill, J. S., Partch, C. L., & Crosby, P. (2025). PERspectives on circadian cell biology. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 380(1918). https://doi.org/10.1098/rstb.2023.0483.

Miller, S., Srivastava, A., Nagai, Y., Aikawa, Y., Tama, F., & Hirota, T. (2021). Structural differences in the FAD-binding pockets and lid loops of mammalian CRY1 and CRY2 for isoform-selective regulation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 118(26). https://doi.org/10.1073/pnas.2026191118.

Minors, D. S., & Waterhouse, J. M. (2013). Circadian rhythms and the human. Butterworth-Heinemann.

Nakagawa, H., & Okumura, N. (2010). Coordinated regulation of circadian rhythms and homeostasis by the suprachiasmatic nucleus. Proceedings of the Japan Academy, Series B, 86(4), 391-409. https://doi.org/10.2183/pjab.86.391.

Nakahata, Y., Yoshida, M., Takano, A., Soma, H., Yamamoto, T., Yasuda, A., Nakatsu, T., & Takumi, T. (2008). A direct repeat of E-box-like elements is required for cell-autonomous circadian rhythm of clock genes. BMC Molecular Biology, 9(1), 1. https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-1.

Ohdo, S., Koyanagi, S., & Matsunaga, N. (2019). Chronopharmacological strategies focused on chrono-drug discovery. Pharmacology & Therapeutics, 202, 72-90. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.05.018.

Ono, D., Weaver, D. R., Hastings, M. H., Honma, K.-I., Honma, S., & Silver, R. (2024). The Suprachiasmatic Nucleus at 50: Looking Back, Then Looking Forward. Journal of Biological Rhythms, 39(2), 135-165. https://doi.org/10.1177/07487304231225706.

Ozber, N., Baris, I., Tatlici, G., Gur, I., Kilinc, S., Unal, E. B., & Kavakli, I. H. (2010). Identification of two Amino Acids in the C-terminal Domain of Mouse CRY2 Essential for PER2 Interaction. BMC Molecular Biology, 11(1), 69. https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-69.

Ozburn, A. R., Purohit, K., Parekh, P. K., Kaplan, G. N., Falcon, E., Mukherjee, S., Cates, H. M., & McClung, C. A. (2016). Functional Implications of the CLOCK 3111T/C Single-

Nucleotide Polymorphism. Frontiers in Psychiatry, 7. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2016.00067.

Parico, G. C. G., & Partch, C. L. (2020). The tail of cryptochromes: an intrinsically disordered cog within the mammalian circadian clock. Cell Communication and Signaling, 18(1), 182. https://doi.org/10.1186/s12964-020-00665-z.

Partch, C. L. (2020). Orchestration of Circadian Timing by Macromolecular Protein Assemblies. Journal of Molecular Biology, 432(12), 3426-3448. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.12.046.

Patke, A., Murphy, P. J., Onat, O. E., Krieger, A. C., Özçelik, T., Campbell, S. S., & Young, M. W. (2017). Mutation of the Human Circadian Clock Gene CRY1 in Familial Delayed Sleep Phase Disorder. Cell, 169(2), 203-215.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.027.

Postolache, T. T., & Raheja, U. K. (2016). Body Rhythms/Biological Clocks. Içinde H. S. Friedman (Ed.), Encyclopedia of Mental Health (Second Edition) (ss. 193-203). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397045-9.00122-1.

Rahman, S., Wittine, K., Sedić, M., & Markova-Car, E. P. (2020). Small Molecules Targeting Biological Clock; A Novel Prospective for Anti-Cancer Drugs. Molecules, 25(21), 4937. https://doi.org/10.3390/molecules25214937.

Raible, F., Takekata, H., & Tessmar-Raible, K. (2017). An overview of monthly rhythms and clocks. Frontiers in Neurology (C. 8, Sayı MAY). Frontiers Research Foundation. https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00189.

Ramkisoensing, A., & Meijer, J. H. (2015). Synchronization of biological clock neurons by light and peripheral feedback systems promotes circadian rhythms and health. Içinde Frontiers in Neurology (C. 6, Sayı MAY). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00128.

Refinetti, Roberto. (2000). Circadian physiology. CRC Press.

Reid, K. J. (2019). Assessment of Circadian Rhythms. Içinde Neurologic Clinics (37, 3, 505-526). W.B. Saunders. https://doi.org/10.1016/j.ncl.2019.05.001.

Roenneberg, T., & Foster, R. G. (1997). Twilight Times: Light and the Circadian System. Photochemistry and Photobiology (C. 66, Sayı 5, ss. 549-561). American Society for Photobiology. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb03188.x.

Roenneberg, T., & Merrow, M. (2005). Circadian clocks — the fall and rise of physiology. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6(12), 965-971. https://doi.org/10.1038/nrm1766.

Roenneberg, T., & Merrow, M. (2016). The circadian clock and human health. Current Biology (26, 10, R432-R443). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.011.

Rosensweig, C., Reynolds, K. A., Gao, P., Laothamatas, I., Shan, Y., Ranganathan, R., Takahashi, J. S., & Green, C. B. (2018). An evolutionary hotspot defines functional differences between CRYPTOCHROMES. Nature Communications, 9(1), 1138. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03503-6.

Salazar, A., & von Hagen, J. (2023). Circadian Oscillations in Skin and Their Interconnection with the Cycle of Life. International Journal of Molecular Sciences, 24(6), 5635. https://doi.org/10.3390/ijms24065635.

Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K. A., FitzGerald, G. A., Kay, S. A., & Hogenesch, J. B. (2004). A Functional Genomics Strategy Reveals Rora as a Component of the Mammalian Circadian Clock. Neuron, 43(4), 527-537. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.018.

Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carré, I. A., & Coupland, G. (1998). The late elongated hypocotyl Mutation of Arabidopsis Disrupts Circadian Rhythms and the Photoperiodic Control of Flowering. Cell, 93(7), 1219-1229. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81465-8.

Schmalen, I., Reischl, S., Wallach, T., Klemz, R., Grudziecki, A., Prabu, J. R., Benda, C., Kramer, A., & Wolf, E. (2014). Interaction of Circadian Clock Proteins CRY1 and PER2 Is Modulated by Zinc Binding and Disulfide Bond Formation. Cell, 157(5), 1203-1215. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.057.

Schmitt, K., Krähenbühl, S., Eckert, A., & Basel, S. F. (2016). Regulation of mitochondrial dynamics and bioenergetics: implications of circadian clock and neurosteroids in health and diseases Inauguraldissertation.

Sharma, D., & Partch, C. L. (2024). PAS Dimerization at the Nexus of the Mammalian Circadian Clock. Journal of Molecular Biology, 436(3), 168341. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168341.

Sharma, V. K., & Chandrashekaran, M. K. (2005). Zeitgebers (time cues) for biological clocks. Current Science, 89(7), 1136-1146. http://www.jstor.org/stable/24110966.

Shen, Y., Lv, Q., Xie, W., Gong, S., Zhuang, S., Liu, J., Mao, C., & Liu, C. (2023). Circadian disruption and sleep disorders in neurodegeneration. Translational Neurodegeneration, 12(1), 8. https://doi.org/10.1186/s40035-023-00340-6.

Shirogane, T., Jin, J., Ang, X. L., & Harper, J. W. (2005). SCFβ-TRCP Controls Clock-dependent Transcription via Casein Kinase 1-dependent Degradation of the Mammalian Period-1 (Per1) Proteinm*. Journal of Biological Chemistry, 280(29), 26863-26872. https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M502862200.

Siepka, S. M., Yoo, S.-H., Park, J., Song, W., Kumar, V., Hu, Y., Lee, C., & Takahashi, J. S. (2007). Circadian Mutant Overtime Reveals F-box Protein FBXL3 Regulation of Cryptochrome and Period Gene Expression. Cell, 129(5), 1011-1023. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.030.

Smieszek, S. P., Brzezynski, J. L., Kaden, A. R., Shinn, J. A., Wang, J., Xiao, C., Polymeropoulos, C., Özçelik, T., & Polymeropoulos, M. H. (2021). An observational study investigating the CRY1Δ11 variant associated with delayed sleep–wake patterns and circadian metabolic output. Scientific Reports, 11(1), 20103. https://doi.org/10.1038/s41598-021-99418-2.

Solt, L. A., Kojetin, D. J., & Burris, T. P. (2011). The REV-ERBs and RORs: Molecular Links Between Circadian Rhythms and Lipid Homeostasis. Future Medicinal Chemistry, 3(5), 623- 638. https://doi.org/10.4155/fmc.11.9.

Srikanta, S. B., & Cermakian, N. (2021). To Ub or not to Ub: Regulation of circadian clocks by ubiquitination and deubiquitination. Içinde Journal of Neurochemistry (157, 1, 11-30). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/jnc.15132.

Srivastava, D., Shamim, Md., Kumar, M., Mishra, A., Maurya, R., Sharma, D., Pandey, P., & Singh, K. N. (2019). Role of circadian rhythm in plant system: An update from development to stress response. Environmental and Experimental Botany, 162, 256-271. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.025.

Starnes, A. N., & Jones, J. R. (2023). Inputs and Outputs of the Mammalian Circadian Clock. Biology, 12(4), 508. https://doi.org/10.3390/biology12040508.

Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T. F., Raman, R., Somers, D. E., Más, P., Panda, S., Kreps, J. A., & Kay, S. A. (2000). Cloning of the Arabidopsis Clock Gene TOC1, an Autoregulatory Response Regulator Homolog. Içinde New Series (289, 5480).

Su, K., Din, Z. U., Cui, B., Peng, F., Zhou, Y., Wang, C., Zhang, X., Lu, J., Luo, H., He, B., Kelley, K. W., & Liu, Q. (2022). A broken circadian clock: The emerging neuro-immune link connecting depression to cancer. Brain, Behavior, & Immunity-Health, 26, 100533. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbih.2022.100533.

Takahashi, J. S. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. Nature Reviews Genetics, 18(3), 164-179. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.150.

Tischkau, S. A. (2020). Mechanisms of circadian clock interactions with aryl hydrocarbon receptor signalling. European Journal of Neuroscience, 51(1), 379-395. https://doi.org/10.1111/ejn.14361.

Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptáček, L. J., & Fu, Y.-H. (2001). An hPer2 Phosphorylation Site Mutation in Familial Advanced Sleep Phase Syndrome. New Series (291, 5506).

Trott, A. J., & Menet, J. S. (2018). Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK:BMAL1. PLOS Genetics, 14(1), e1007156. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007156.

van Ooijen, G., Hindle, M., Martin, S. F., Barrios-Llerena, M., Sanchez, F., Bouget, F.-Y., O'Neill, J. S., Le Bihan, T., & Millar, A. J. (2013). Functional Analysis of Casein Kinase 1 in a Minimal Circadian System. PLoS ONE, 8(7), e70021. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070021.

Vatakis, Argiro., Balci, Fuat., Di Luca, Massimiliano., & Correa, A. (2018). Timing and time perception : procedures, measures, and applications. Brill.

Videnovic, A., & Golombek, D. (2013). Circadian and sleep disorders in Parkinson's disease. Experimental Neurology, 243, 45-56. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.08.018.

Von Schantz, M., & Archer, S. N. (2003). Clocks, genes and sleep. Içinde OF SLEEP MEDICINE (C. 96).

Waddington Lamont, E., Legault-Coutu, D., Cermakian, N., & Boivin, D. B. (2007). The role of circadian clock genes in mental disorders. Dialogues in Clinical Neuroscience, 9(3), 333-342. https://doi.org/10.31887/DCNS.2007.9.3/elamont.

Wallach, T., & Kramer, A. (2015). Chemical chronobiology: Toward drugs manipulating time. FEBS Letters, 589(14), 1530-1538. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.059.

Wang, Z.-Y., & Tobin, E. M. (1998). Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. Cell, 93(7), 1207-1217. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81464-6

Welsh, D. K., Takahashi, J. S., & Kay, S. A. (2010). Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. Annual Review of Physiology, 72(1), 551-577. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135919.

Williams, S. B. (2006). A Circadian Timing Mechanism in the Cyanobacteria. Içinde R. K. Poole (Ed.), Advances in Microbial Physiology (C. 52, ss. 229-296). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2911(06)52004-1.

Wulund, L., & Reddy, A. B. (2015). A brief history of circadian time: The emergence of redox oscillations as a novel component of biological rhythms. Perspectives in Science, 6, 27-37. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pisc.2015.08.002.

Xing, L., An, Y., Shi, G., Yan, J., Xie, P., Qu, Z., Zhang, Z., Liu, Z., Pan, D., & Xu, Y. (2017). Correlated evolution between CK1δ protein and the serine-rich motif contributes to regulating the mammalian circadian clock. Journal of Biological Chemistry, 292(1), 161-171. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.751214.

Xu, Y., Padiath, Q. S., Shapiro, R. E., Jones, C. R., Wu, S. C., Saigoh, N., Saigoh, K., Ptáček, L. J., & Fu, Y.-H. (2005). Functional consequences of a CKIδ mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. Nature, 434(7033), 640-644. https://doi.org/10.1038/nature03453.

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. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155105

Yang, X., Wood, P. A., Ansell, C. M., Quiton, D. F. T., Oh, E.-Y., Du-Quiton, J., & Hrushesky, W. J. M. (2009). The circadian clock gene per1 suppresses cancer cell proliferation and tumor growth at specific times of day. Chronobiology International, 26(7), 1323-1339. https://doi.org/10.3109/07420520903431301.

Yang, Y.-D., Zeng, Y., Li, J., Zhou, J.-H., He, Q.-Y., Zheng, C.-J., Reichetzeder, C., Krämer, B. K., &Hocher, B. (2023). Association of BMAL1 clock gene polymorphisms with fasting glucose in children. Pediatric Research, 94(2), 653-659. https://doi.org/10.1038/s41390-023-02467-8.

Yao, J., He, C., Zhao, W., Hu, N., & Long, D. (2021). Circadian clock and cell cycle: Cancer and chronotherapy. Acta Histochemica, 123(8), 151816. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151816.

Yu, W., Nomura, M., & Ikeda, M. (2002). Interactivating Feedback Loops within the Mammalian Clock: BMAL1 Is Negatively Autoregulated and Upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. Biochemical and Biophysical Research Communications, 290(3), 933-941. https://doi.org/https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6300.

Zhang, R., Lahens, N. F., Ballance, H. I., Hughes, M. E., & Hogenesch, J. B. (2014). A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(45), 16219-16224. https://doi.org/10.1073/pnas.1408886111.

Zhang, T., Liu, Y., & Yang, L. (2023). Amplitude response and singularity behavior of circadian clock to external stimuli. npj Systems Biology and Applications, 9(1), 39. https://doi.org/10.1038/s41540-023-00300-w.

Zhang, Z., Xin, H., & Li, M. D. (2020). Circadian Rhythm of Lipid Metabolism in Health and Disease. Içinde Small Methods (C. 4, Sayı 7). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/smtd.201900601.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ebru TORAMAN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokunun.
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	16.06.2023

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Biyoteknoloji