



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**REV-ERB α/β 'NİN TRAVMATİK BEYİN HASARINDA
ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

MAHMUD ESAD PENÇE

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi MUSTAFA ÇAĞLAR BEKER

İSTANBUL - 2023

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Biyokimya
Tez Sahibi : Mahmud Esad PENÇE
Tez Başlığı : Rev-Erb α/β 'nın Travmatik Beyin Hasarında Rolünün
İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 12.06.2023

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Danışman</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmza</u>
Dr.Öğr.Üyesi Mustafa Çağlar BEKER	İstanbul Medipol Üniversitesi	

Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ	İstanbul Medipol Üniversitesi
Prof.Dr. Türkan YİĞİTBAŞI	İstanbul Medipol Üniversitesi
Doç.Dr. Saime BATIREL	Marmara Üniversitesi
Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ	İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun
...../...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil
yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

MAHMUD ESAD PENÇE

İTHAF



*“Bu tez
aileme ithaf edilmiştir...”*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başından sonuna kadar bana rehberlik eden, destekleyen, yeni ufuk ve vizyon katan danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER'e en derin minnettarlığımı sunuyorum.

Doktora ve tez sürecimde desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bilim ve hayat üzerine düşüncelerimi her daim geliştiren ve zor zamanlarımda umudumu kaybetmememi sağlayan Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ ve Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ'ye en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca REMER araştırma merkezinde tez sürecim boyunca katkılarını esirgemeyen Serdar ALTUNAY, Elif SERTEL EVREN, Zeynep BALÇIKANLI ve Mehmet Özgen ALTINTAŞ'a teşekkür ediyorum.

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim dostlarım Dr. Fatih KORKMAZ, Dr. Abdullah IŞIK, Dr. Metin ÖZMEN, Dr. Sinan CİHAN, Dr. M. İhsan ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkürleri borç bilirim.

Son olarak çocukluğumdan bugüne kadar imkânsız denilen hedeflerin mümkün olduğunu öğreten ve zorlukların içerisindeki kolaylıkları bana gösteren, zor günlerimde yanımda olmaktan vazgeçmeyen, muhabbetlerini benden hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer babam Sadrettin PENÇE'ye, sevgili annem Halime PENÇE'ye, abim M. İsmail PENÇE'ye kardeşlerim N. Ahmed PENÇE ve H. Kerime PENÇE'ye ve sevgili eşim İlknur PENÇE'ye sonsuz teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Travmatik Beyin Hasarı	5
4.2. Travmatik Beyin Hasarı Patofizyolojisi.....	6
4.2.1. Eksitotoksisite	7
4.2.2. TBH’de reaktif oksijen radikalleri	8
4.2.3. Hücre ölümü	9
4.2.4. Beyin ödemi	11
4.2.5. Nöroinflamasyon.....	12
4.3. Sirkadiyen Ritim	13
4.3.1. Sirkadiyen ritmin moleküler mekanizması.....	14
4.4. MSS ve Sirkadiyen Ritim.....	17
4.5. Rev-Erb Proteinleri	18
4.5.1. RevErb ve İnflamasyon.....	19
4.5.2. RevErb ve Nöronal uyarılma.....	20
5. MATERYAL METOT	21
5.1. Deney Grupları.....	21
5.2. Deney Planı ve Deneyin Sonlandırması.....	22
5.3. Moleküler Klonlama Çalışmaları	23

5.3.1. Rev-Erb α / β (Nr1D1/Nr1D2) için primer dizaynı.....	23
5.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ile Nr1d1/Nr1d2 genlerinin çoğaltılması.....	24
5.3.3. Nr1D1/Nr1D2 DNA örneklerinin agaroz jelden izolasyonu.....	26
5.3.4. Nr1d1/Nr1d2 genlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi	27
5.3.5. Nr1d1 ve Nr1d2 ürünlerini saflaştırma ve konsantre hale getirme işlemi ...	28
5.3.6. Nr1d1/Nr1d2 ürünleri için ligasyon işleminin gerçekleştirilmesi.....	28
5.3.7. Nr1D1/Nr1D2 plazmidlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilerek kontrol edilmesi	29
5.3.8. RevErb α ve RevErb β inhibisyon plasmidlerinin klonlanması	30
5.3.9. Nr1d1 ve Nr1d2 plazmidlerinin yüksek miktarda üretilmesi.....	30
5.3.10. Yüksek Miktarda Lentivirüs Üretimi ve Saflaştırılması	31
5.3.11. Virüs Titrasyonunun Belirlenmesi	32
5.4. Deney Hayvanı Çalışmaları	33
5.4.1. Beyin içi enjeksiyon yöntemiyle virüslerin verilmesi.....	33
5.4.2. Travmatik beyin hasarı operasyonları	33
5.5. Cryostat Cihazıyla Beyinlerin Kesilmesi	34
5.6. İmmün Boyamalar.....	35
5.6.1. Apoptotik hücre tayini.....	35
5.6.2. Nöronal sağkalım analizi.....	36
5.6.3. Kan beyin bariyeri geçirgenliği analizi	36
5.6.4. Beyin ödemi ve hasar hacmi	36
5.7. Western Blot.....	37
5.8. Proteomik Analizler	39
5.8.1. FASP (Filter-Aided Sample Preparation) protokolü.....	39
5.8.2. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (Lc-Ms/Ms) Analizi	40
5.9. İstatistiksel Analizler.....	41
6. BULGULAR.....	42
6.1. Lentivirüs Etkinliğinin Western Blot Yöntemiyle Gösterimi	42
6.2. Hasar Hacmi ve Ödem Analizi.....	45
6.3. Nöronal Sağkalım Analizi.....	49
6.4. Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliği	51
6.5. DNA Fragmantasyon Analizi.....	54

6.6. Proteomik Analizler	56
7. TARTIŞMA	70
8. SONUÇ.....	75
9. KAYNAKLAR	76
10. ETİK KURUL ONAYI.....	91
11. ÖZGEÇMİŞ.....	92



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ACN	Asetonitril
ADP	Adenozin Difosfat
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
APAF-1	Apoptotik Protein Aktive edici Faktör-1
ATP	Adenozin Trifosfat
BMAL1	Brain and Muscle ARNT-Like protein 1
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CLOCK	Circadian Locomoter Output Cycles Protein Kaput
Co-IP	Eş-immünpresipitasyon
CytC	Sitokrom C
DIA	Data Independent Acquisition
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FA	Formik Asit
FASP	Filtre Yardımlı Örnek Hazırlama Protokolü
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
HIF-1	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-1
IAA	İyot Asetamid
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
ROS	Reaktif Oksijen Türleri

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 5.3.2.1. Nr1d1/ Nr1d2 genleri için PZR hesaplamaları.....	25
Tablo 5.3.2.2. Nr1d1/ Nr1d2 genleri için PZR termal döngüsü.....	25
Tablo 5.3.4.1. Nr1d1 ile Lenti-Efl α -GFP-2A-Puro vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesim hesaplamaları	27
Tablo 6.6.1 Proteomik analizlerle protein ifade artırımını yapılan gruplarda (Lv-GFP, Lv-RevErb α , LvRevErb β , Lv-RevErb α + Lv-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi.....	58
Tablo 6.6.2. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scrRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi.....	59
Tablo 6.6.3. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scrRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi.....	60
Tablo 6.6.4. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scrRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi.....	61
Tablo 6.6.5. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scrRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi.....	62
Tablo 6.6.6. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scrRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi.....	63

Tablo 6.6.7. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi.....	64
Tablo 6.6.8. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi.....	65
Tablo 6.6.9. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi.....	66
Tablo 6.6.10. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi.....	67

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1. Travmatik beyin hasarı epidemiyolojisi İskemi patofizyolojisi..	6
Şekil 4.2.1.1. TBH’de Reaktif Oksijen Radikalleri oluşmu.	8
Şekil 4.3.1. Sirkadiyen moleküler saat mekanizması Deney dizaynı.	15
Şekil 5.2.1. Deney dizaynı.	23
Şekil 5.3.1. Primer dizilimi ve kesim enzimleri.....	24
Şekil 5.3.2.1. NR1D1 gen dizisinin PCR ile çoğaltılması ve agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	26
Şekil 5.3.2.2 NR1D2 gen dizisinin PCR ile çoğaltılması ve agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	26
Şekil 5.3.6.1. Rekombinant vektör oluşum mekanizması.....	29
Şekil 5.3.7.1. Nr1D1/Nr1D2 plazmidlerinin jel görüntüleri.....	30
Şekil 5.3.10.1. HEK293T hücre besiyerleri toplandıktan sonra plakalardaki enfekte olmuş hücrelerin mikroskop görüntüsü A) Lv-GFP. B) Lv-RevErb α . C) Lv-RevErb β . D) ScRNA. E) Sh-RevErb α . F) Sh-RevErb β	32
Şekil 5.5.1. Cryostat cihazı.	35
Şekil 5.7.1. Qubit 3.0 cihazı.....	37
Şekil 5.7.2. Trans-Blot Turbo transfer sistemi.....	38
Şekil 5.7.3. Chemidoc MP görüntüleme sistemi.	39
Şekil 5.8.2.1. LC-MS/MS cihazı.....	40
Şekil 6.1.1. Lv-GFP ve Lv-RevErb α ’nın RevErb α protein ifadesi üzerine etkisi.	42
Şekil 6.1.2. Lv-GFP ve Lv-RevErb β ’nın RevErb β protein ifadesi üzerine etkisi	43

Şekil 6.1.3. scRNA ve Sh-RevErb α 'nın RevErb α protein ifadesi üzerine etkisi.....	44
Şekil 6.1.4. scRNA ve Sh-RevErb β 'nin RevErb β protein ifadesi üzerine etkisi.....	45
Şekil 6.2.1. Cresyl violet boyamasıyla protein ifade artışı gerçekleştirilen grupların gösterimi.....	46
Şekil 6.2.2. TBH sonrası protein ifade artırımı yapılan gruplarda (Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α + Lv-RevErb β grupları) hasar hacmi analizi ..	46
Şekil 6.2.3. Cresyl violet boyamasıyla protein inhibisyonu gerçekleştirilen grupların gösterimi.....	47
Şekil 6.2.4. TBH sonrası protein ifadesi baskılanan deney gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) hasar hacminin analizi ..	47
Şekil 6.2.5. TBH sonrası protein ifadesi baskılanan deney gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) beyin ödemi analizi ..	48
Şekil 6.2.6. TBH sonrası protein ifadesi baskılanan deney gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) beyin ödemi analizi ..	49
Şekil 6.3.1. TBH sonrasında nöronal çekirdek (NeuN) boyaması.....	50
Şekil 6.3.2. Protein ifade artırımı yapılan gruplarda (Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α +Lv-RevErb β grupları) nöronal sağkalımın değerlendirilmesi.	50
Şekil 6.3.3. Protein ifadesi baskılanan deney gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) nöronal sağkalımın değerlendirilmesi.	51
Şekil 6.4.1. Protein ifade artırımı yapılan deney gruplarında (Lv-GFP, Lv- RevErb α , Lv- RevErb β , Lv- RevErb α + Lv-RevErb β grupları) kan-beyin bariyeri geçirgenliği analizi ..	52

Şekil 6.4.2. Protein ifadesi baskılanmış deney gruplarında (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) kan-beyin bariyeri geçirgenliği 53

Şekil 6.5.1. TBH sonrası TUNEL boyaması..... 54

Şekil 6.5.2. Protein ifade artırımı yapılan deney gruplarında (Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α + Lv-RevErb β grupları) TUNEL boyaması aracılığıyla DNA fragmentasyonunun belirlenmesi..... 55

Şekil 6.5.3. Protein ifadesi baskılanmış deney gruplarında (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) TUNEL boyaması aracılığıyla DNA fragmentasyonunun belirlenmesi 56



1. ÖZET

REV-ERB α/β 'NİN TRAVMATİK BEYİN HASARINDA ROLÜNÜN İNCELENMESİ

Travmatik beyin hasarı (TBH) bir dış kuvvetin etkisiyle beyin fonksiyonunda ya da fizyolojisinde meydana gelen ve yüksek ölüm oranında sahip bir hastalıktır. Son yıllarda yapılan araştırmalar sirkadiyen ritmin TBH patofizyolojisinde önemli rollerinin olabileceğini göstermektedir. Bu tez kapsamında sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde önemli görevleri bulunan Rev-Erb α/β 'nin farelerde gerçekleştirilen TBH sonrasındaki patofizyolojik süreçlere etkisi araştırıldı. Bu amaçla 8-12 haftalık erkek Balb/C farelerinde lentiviral vektörler kullanılarak Rev-Erb α , Rev-Erb β veya Rev-Erb α/β protein ifadeleri artırıldı veya azaltıldı. Sonrasında Rev-Erb α/β 'nin beyin ödemi, enfarktüs hacmi, kan beyin bariyeri (KBB) geçirgenliği, nöronal sağkalım ve DNA hasarı yanı sıra Rev-Erb α/β 'nin TBH sonrası etkilediği protein profili sıvı kromatografi-kütle spektrometresi aracılı proteomik analizlerle gösterildi. RevErb α protein ifadesinin artması TBH sonrasında KBB geçirgenliğini azalttığı ve nöronal sağkalımı artırdığı görüldü. RevErb β ve RevErb α/β ifade artışının enfarktüs hacmini ve KBB geçirgenliğini azalttığı, nöronal sağkalımı artırdığı gösterildi. RevErb α 'nın baskılanması nöronal hücre ölümünü ve DNA fragmantasyonunu artırdığı tespit edildi. RevErb β 'nin inhibisyonu hasar hacmini, KBB geçirgenliğini ve nöronal ölümü artırdığı gözlemlendi. RevErb α ve RevErb β 'nin birlikte baskılanmasıyla hasar hacminin, KBB geçirgenliğinin, apoptozun ve nöronal hücre ölümünün arttığı gösterildi. Ayrıca proteomik analizlerde Rev-Erb α/β artışlarına bağlı 46; inhibisyonlarına bağlı olarak 402 farklı proteinin en az 1.4 kat ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) şekilde değiştiği gösterildi. Elde edilen sonuçlar Rev-Erb α/β 'nin TBH sonrasında gelişen patofizyolojik süreçlerde önemli rollerinin olduğu gösterildi.

Bu tez TÜBİTAK tarafından 121S420 proje numarası ile 1002 projesi kapsamında desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Lentivirüs; Proteomiks; RevErb; Sirkadiyen ritim; Travma

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ROLE OF REV-ERB α/β IN TRAUMATIC BRAIN INJURY

Traumatic brain injury (TBI) is a disease defined by alterations in brain function or physiology triggered by an external force, and it is associated with high mortality and morbidity. The role RevErb α/β , whose protein expression was increased or decreased by lentiviral vectors, in the pathophysiology of TBI was investigated in this thesis. Furthermore, large-scale proteomic analyses have revealed the Rev-Erb α/β -dependent altered protein profile. Within the scope of this thesis, lentivirus-mediated Rev-Erb α/β protein levels were increased or decreased in 8–12-week-old male Balb/C mice. The TBI procedure was performed 10 days after the lentivirus injection. Brain oedema, infarct volume, blood-brain barrier (BBB) permeability, neuronal survival, and DNA fragmentation due to changes in Rev-Erb α/β protein levels after TBI, as well as proteins affected by Rev-Erb α/β after TBI, were determined by liquid chromatography-mass spectrometry-mediated proteomic analysis. Increased RevErb α protein levels reduced DNA fragmentation and improved neuronal survival following TBI. Increased RevErb β or RevErb α/β expression decreased infarct volume, DNA fragmentation, and BBB permeability while improving neuronal survival. After TBI, decreasing RevErb α has been observed to increase neuronal death and DNA fragmentation. Suppression of RevErb β increased the volume of injury, BBB permeability, and neuronal death. It has been shown that suppressing both RevErb α ve RevErb β increases neuronal death, BBB permeability, and injury volume. In addition, proteomic analysis revealed that overexpression of Rev-Erb α/β altered 46 different proteins, whereas inhibition of Rev-Erb α/β altered 402 different proteins. According to the findings, Rev-Erb α/β plays critical roles in the pathophysiological processes that develop following TBI. This thesis was supported by TUBITAK through the 1002 project with the project number 121S420.

Keywords: Circadian rhythm; Lentivirus; Proteomics; RevErb; TBI

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Travmatik beyin hasarı (TBH) bir dış kuvvetin etkisiyle beyin fonksiyonunda ya da fizyolojisinde meydana gelen değişimler olarak tanımlanmaktadır (1). TBH yüksek oranda mortalite ve morbiditenin önemli nedenlerinden biridir. Özellikle genç nüfusta insidansının son zamanlarda arttığı bilinmektedir. Modern tıptaki gelişmelere rağmen TBH sonrası sağ kalanlarda oluşan fiziksel, psikiyatrik, duygusal ve bilişsel komplikasyonlar topluma ve hasta bireye ciddi yük oluşturmaktadır. Patofizyolojisi de tam olarak aydınlatılmamış olan TBH'in FDA onaylı etkin bir tedavisi mevcut değildir.

TBH patofizyolojisi, birbiriyle ilişkili iki farklı süreç olan birincil ve ikincil beyin hasarı ile açıklanmaktadır. Birincil hasar; travma anında oluşan hasar ile ortaya çıkar. Bu hasar sonucu intrakraniyal hematoma ve kontüzyonlar oluşmaktadır. İkincil beyin hasarı ise ilk travma anında başlayan saatlerce veya günlerce sürebilen moleküller hasar mekanizmaları kaskatı olarak düşünülmektedir (2,3). Bu mekanizmalar: Nörotransmitter aracılı glutamat, eksitotoksikite serbest radikal hasarı, elektrolit dengesizliği, mitokondriyal disfonksiyon, inflamatuvar reaksiyonlar ve apoptozdur (4,5).

Bu çeşitli hücresel yaralanma yolları, TBH'de ikincil beyin hasarını önlemek için nöroprotektif tedavilerin gelişimine yönelik kapsamlı klinik öncesi çalışmanın odak noktası olmuştur. Sirkadiyen ritim, organizmada davranış ve fizyolojik paternleri düzenleyen dışarıdan bağımsız endojen bir şekilde oluşan yaklaşık 24 saat süren bir döngüdür. Organizma dışarıdan ışık, ısı gibi uyaranlar vasıtasıyla çevresiyle senkronize olur. Hücre seviyesinde bu ritimler yaklaşık bir güne karşılık gelen hücreye özgü ritmik gen ekspresyonları şeklinde gözlenir. Bu ritmik gen ekspresyonları her ne kadar dokuya özgü olsa da bu genlerin düzenlenmesi tüm hücrelerde bulunan saat benzeri bir mekanizma tarafından oluşturulur ve düzenlenir (89).

Nükleer reseptör REV-ERB α/β sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde görevli olan BMAL1'in (Brain and muscle ARNT-like protein 1) promotör bölgesine bağlanarak

BMAL1'in transkripsiyonel aktivitesini inhibe etmektedir. REV-ERB'ler, ligand bağlama alanları, transkripsiyonel koaktivatör proteinleri bağlamak için önemli olan C-terminal aktivasyon fonksiyonu-2 (AF-2) sarmalından yoksun olması NR'ler arasında onları benzersiz yapmaktadır (6). Bu yapısal farklılık nedeniyle transkripsiyonel proteinlerine bağlanarak transkripsiyonu baskıladığı düşünülmektedir. Ayrıca REV-ERB'lerin ligandı diğer nükleer reseptörler gibi hormon değil hem proteindir. Gerek yapısal farklılıkları gerekse ligandı nedeniyle REV-ERB'i hastalıklar için potansiyel bir hedef yapmaktadır. Rev-Erb proteinlerinin bir nükleer reseptör olması, Rev-Erb'i mevcut küçük moleküllü agonistlerle ve antagonist modüle edilebilen çekici bir terapötik hedef haline getirmektedir (7,8).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında dokuya spesifik olarak uygulanabilen lentiviral vektörler yardımıyla Rev-Erb α ve Rev-Erb β protein seviyesi artırılarak veya azaltılarak Rev-Erb α ve Rev-Erb β 'nin travmatik beyin hasarı patofizyolojisine etkisi araştırılacaktır.

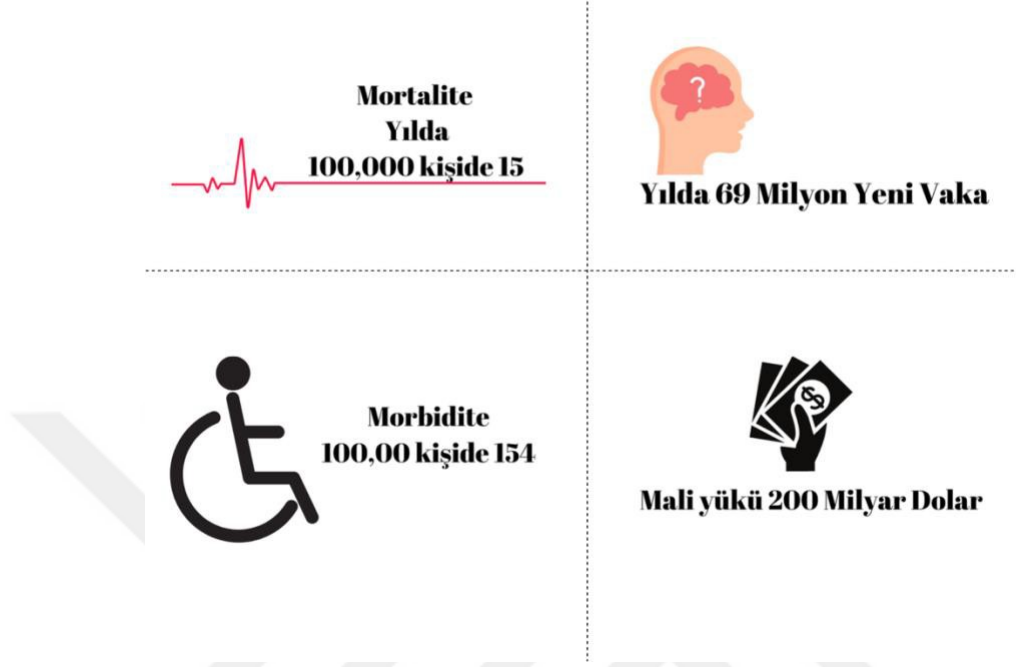
4. GENEL BİLGİLER

4.1. Travmatik Beyin Hasarı

Travmatik beyin hasarı, dış bir kuvvetin (çarpma, darbe, sarsıntı veya delici kafa yaralanması) etkisiyle beyin fonksiyonunda ya da patolojisinde meydana gelen değişimler olarak tanımlanmaktadır. Tanım gereği bu değişimlerden biri: bilinç kaybı veya bozukluğu, yaralanmadan önceki veya sonraki olaylarla ilgili hafıza kaybı, nörolojik defisitler (güç kaybı, denge kaybı, görme değişikliği vb.) veya mental konfüzyon, oryantasyon bozukluğu vb. içermelidir (9–11). Her yıl 64–74 milyon kişinin etkilendiği TBH, ölüm veya maluliyetin önde gelen nedenlerinden biri olarak küresel bir toplum sorunudur. Bununla birlikte akut bakım, rehabilitasyon, kalıcı nörolojik sakatlık dahil olmak üzere sağlık sistemi üzerinde oluşturduğu yükü nedeniyle TBH'nin toplum için sosyoekonomik yükü önemli ölçüde artmaktadır (12). Küresel ölçekte her yıl 10 milyondan fazla hastaneye yatış ve 200 milyar doları aşan bir mali yüke sahiptir (13–15). Dünya çapında hafif TBH tüm vakaların %81'ini oluştururken, kalan %19 'u orta ve şiddetli TBH'dir (16). Dünya genelinde mortalite oranı 100 kişide 0,9 ile 7,6 arasında değişmektedir (11,17). Yıllık insidansı ise 100.000 de 242 ile 317 arasındadır (18). Pediatrik vakaların dünya çapında insidansı, 100.000 çocukta 47 ile 280 arasında olup vakaların %20 orta veya şiddetli TBH vakası görünerek klinik şiddet oranları yetişkinlere benzerdir (19). ABD ve Avrupa'da yaklaşık 12 milyon kişi TBH-ilişkili fonksiyon kaybından etkilenmiştir. Travmatik beyin hasarının, 2030'a kadar nörolojik hastalıklardan kaynaklanan en önemli engellilik nedeni olarak kalacağı ön görülmektedir (Alzheimer hastalığı veya serebrovasküler bozuklukların katkısından 2–3 kat daha fazladır) ve uluslararası ekonomiye yılda yaklaşık 400 milyar dolara mal olmaktadır (20). Ayrıca insidans ve toplumsal yükü yüksek olmasına rağmen şu anda Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA; U.S. Food and Drug Administration) onaylı herhangi spesifik bir tedavi metodu da bulunmamaktadır.



TBH Epidemiyolojisi



Şekil 4.1.1. Travmatik beyin hasarı epidemiyolojisi.

4.2. Travmatik Beyin Hasarı Patofizyolojisi

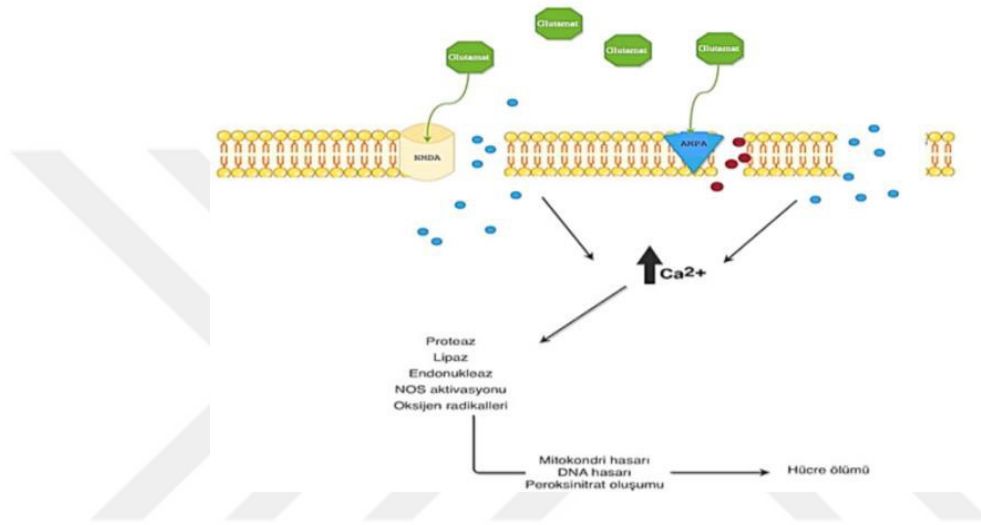
Klasik olarak klinik şiddetine göre sınıflandırılrsa da TBH kendine özgü patolojisi olan çok sayıda alt tipe sahip heterojen bir hastalıktır (21). Travmatik beyin hasarı (TBH) mekanik kuvvetin etkisiyle oluşan hipoksi ve vasküler kontüzyonun indüklediği astrogliosis, glial aktivasyon, inflamasyon, hücre ölümü ve doku kaybına yol açan bir dizi süreci ifade eder (22,23). TBH patolojik olarak birincil ve ikincil yaralanma olarak ikiye ayrılır. Birincil hasar travma anında oluşurken ikincil hasar saatler, günler, haftalar, aylar boyunca gelişir. Travmanın oluşturduğu beyin lezyonu birincil hasarın oluşturduğu alan ile sınırlı olmayıp giderek merkezden çevreye doğru yayılan bir genişlemeye sahiptir. Birincil hasar, dış kuvvete maruz kalmaya eşzamanlı olarak meydana gelen beyin dokusundaki ani mekanik değişimler sonucu oluşur. Bu değişimler kontüzyon, damar hasarı, kanama ve aksonal hasarlanmayı içerir. İkincil hasar, birincil hasarı takip eden ve beyin hücrelerinin ölümü, doku bozulması ve atrofi ile sonuçlanan bir dizi metabolik, fizyolojik ve moleküler süreçten oluşur (24–26). Bu süreçler dört kategori altında incelenebilir:(a) iskemi, eksitotoksisite, enerji yetmezliği

ve sonuçta ortaya çıkan hücre ölümü basamakları; (b) ikincil beyin ödem; (c) aksonal yaralanma ve (d) enflamasyon ve rejenerasyon.

4.2.1. Eksitotoksisite

Eksitotoksisite, glutamat ve birtakım uyarıcı amino asitlerin neden olduğu hasar sürecini tanımlar. İlk defa 1957’de Lucas ve Newhouse (27) glutamatın toksisitesini tanımladı. Ardından Olney (28) intraperitoneal glutamat uygulamasının beyin hasarına yol açtığını bildirdi. Glutamat beyinde en çok bulunan nörotransmitter olmakla beraber toksik seviyede maruziyeti nöronal ölüme neden olmaktadır (29). Klinik araştırmalar, TBH’de beyindeki glutamat seviyelerinin yaralanmadan sonra oldukça hızlı bir şekilde zirve yaptığını ve ardından kan beyin bariyerinin (KBB) mekanik olarak bozulması sonucunda 24 ila 48 saat boyunca yüksek seviyelerde kaldığını göstermiştir (30). Yüksek glutamat düzeylerinin, hastalarda eksitotoksisitenin bir komplikasyonu olan depolarizasyon dalgalarının yayılmasına katkıda bulunduğu da öne sürülmüştür (31). Glutamat, postsinaptik terminaldeki iki ana nörotransmitter reseptörü üzerinde etki eder: NMDA reseptörleri ve AMPA reseptörleri. Bunlar, sinaptik aktarım ve plastisitede önemli bir rol oynayan ligand kapılı iyonotropik reseptörlerdir (32,33). AMPA reseptörleri esas olarak postsinaptik nöronu depolarize eden sodyum akışının geçişinde rol oynar; NMDA reseptörleri ise sinyal iletimi için çok önemli olan kalsiyum kapılarını açar. TBH’de yüksek glutamat hücre içi kalsiyum seviyelerinin anormal yükselmesini sağlayarak nöronal ölüme katkıda bulunur (34). Hücre içi yüksek kalsiyum konsantrasyonu, hücre ve mitokondri membranlarına zarar veren fosfolipazları, hücre iskeletine zarar veren proteazları ve DNA parçalanmasına neden olan endonükleazları (hem apoptoz hem de nekroz ile sonuçlanan bir dizi katabolik enzimi) aktive eder (35). Kalsiyum yükündeki aşırı artış, mitokondrinin işlevini de önemli ölçüde etkiler (36). Kalsiyuma bağlı mitokondriyal geçirgenlik uzun süre aktif kalarak kalsiyumun mitokondri çıkışını sağlayarak mitokondri membran potansiyelini bozar. Bu kimyasal ve yapısal değişiklikler elektron taşıma zincirini bozarak mitokondrinin ATP üretmesini engeller (37,38). Ayrıca mitokondri geçirgenliğindeki artışı takiben enzimlerin sızmasıyla kaspaz aracılı apoptoz ve elektron taşıma sisteminin bozulması ROS oluşumuna neden olur (39). TBH’nin karakteristik özelliklerinden biri hipertrofik asteroitlerdir (40). Bu morfolojik değişikliklerle

astrositlerin hasarlı bölgeyi beynin sağlıklı kalanından bir glial yara oluşturarak ayırdığını ve hücre dışı glutamat seviyelerini düzenlediği düşünülüyor (41). Palmer ve ekibi (42) ilk kez TBH hastalarının beyin omurilik sıvısında (BOS) daha yüksek miktarda uyarıcı amino asit bulunduğunu bildirmiştir. Glutamat konsantrasyonunun normal insanlardan 5 kat daha fazla seviyede olduğunu raporladılar. Bu düzey in vitro ortamda nöronal ölüm için yeterlidir (43) Bu araştırmalara karşın, anti-eksitotoksik ilaçların klinik denemeleri çok az etkinlik göstermiştir.



Şekil 4.2.1.1. TBH’de Reaktif Oksijen Radikalleri oluşmu

4.2.2. TBH’de reaktif oksijen radikalleri

İskemi, eksitotoksisite veya bunların kombinasyonu, ikincil hasarın önemli bir komponentidir. Bu mekanizmalar aşırı kalsiyum yüklenmesi, oksidatif stres ve mitokondriyal hasar ile bağlantılıdır. ROS ile antioksidan seviyeleri arasındaki dengesizlik sebebiyle oluşan oksidatif stres TBH sonrası oluşan sekonder hasarda büyük bir role sahiptir. Merkezi sinir sistemi serbest radikal aracılı hasara karşı savunmasızdır. MSS orta düzeyde endojen antioksidanlara ve anti oksidasyon enzimlerine sahiptir. Bu düzeyler travma sonrası hızla düşer (44). MSS’nin yüksek bir metabolik hızı sahiptir bu nedenle özellikle risk altındaki enerji metabolizmasının bir yan ürünü olarak sürekli ROS üretimi mevcut. Ayrıca MSS’deki hücrelerin zarları daha yüksek bir çoklu doymamış yağ asidi yüzdesine sahiptir, bu sebeple lipit peroksidaz zincir reaksiyonuna daha duyarlıdır. Son olarak, merkezi sinir sistemi,

serbest radikal oluşumu ve reaksiyonlarında aktif olarak yer alan bakır ve manganez gibi geçiş metalleri açısından zengindir.

Yetişkin TBH hastalarda yapılan klinik çalışmalar, TBH'den kısa bir süre sonra serebrovasküler akımın azaldığını ve bunun sonucunda ortaya çıkan iskemi terapötik bir hedefi temsil edebileceği düşünülmektedir (45,46). TBH'nin ardından gerçekleşen iskemi sürecinde oksijen seviyesi son derece düşük olması enerji üretimini oksidatif fosforilasyondan oksidatif fosforilasyondan çok daha az verimli olan glikolize geçer. Sonuç olarak, MSS'de ATP üretimi önemli ölçüde azalır (47). Oksijen yokluğunun uzun sürmesi glikoliz ürünleri olan laktat ve pirüvat birikimine bağlı lokalize bir asidoza neden olur. Ortam pH'ındaki azalma, demir ve kalsiyumun mobilizasyonuna tetikler ve bu hareketlilik hücre içi kısır döngüleri neden olur (48). Serbest kalsiyumun sitozolde artışı mitokondri membran potansiyeli kaybına ve en sonunda ROS oluşumuna neden olur. Serbest demir de Fenton reaksiyonu yoluyla ROS oluşumunu artırır. İlk başta oluşan radikaller NO ve H₂O₂ gibi zayıf oksidanlar olmasıyla birlikte zar yapılarından kolayca geçme özelliklerinden dolayı mitokondri içine geçip peroksinitrit ve hidroksil radikalleri gibi daha güçlü oksitleyici ajanlara dönüşebilirler. Nihayetinde, ROS'un mitokondride birikmesiyle mitokondrinin enerji üretimi bozulur (49). ROS, lipid peroksidasyonu, protein karbonilasyonu ve DNA oksidasyonundan sorumlu olup, membran geçirgenliğinde ve akışkanlığında da değişikliklere yol açar. Lipid peroksidasyonu, mitokondriyal membran yapısını bozarak astrositlerin glutamat reseptörleri için toksik olan 4- hidroksinonenal oluşumunu sağlayarak, eksitoksiteyi artırıp doku hasarını şiddetlendirir (50) 4-hidroksinonenal ayrıca kalsiyum rezervlerini harekete geçirirler. Salınan kalsiyumlar fosfolipaz ve DNAz gibi birçok enzimi aktive ederek hasarın daha da artmasına neden olur (51).

4.2.3. Hücre ölümü

TBH'nin ardından görülen hücre ölümlerinin nekrozdaki apoptoza kadar değişen bir morfolojik devamlılık olarak kategorize edilebileceği düşünülmektedir (52,53). Apoptoz, hücre küçülmesi ve nükleer yoğunlaşma, internükleozomal DNA parçalanması ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile tanımlanan hücre ölümünün morfolojik bir tanımıdır (54). Buna karşılık, nekrozdaki ölen hücreler, zarların bozulmasıyla hücrel ve nükleer şişme gösterir. TBH gibi kompleks ve çoklu

mekanizmaları olan hastalıklarda, hücre ölümünün apoptozla mı nekrozla mı olduğunu klasik tanımlarına göre ayırt etmek oldukça zordur (55). Bazı hücreler, hem nekrozda görülen nükleer ve hücrel şişme, hem de normalde programlanmış hücre ölümünde gözüken proteazların aktivasyonları ve DNA fragmantasyonu gösterebilir (56). Travmatik beyin hasarında hem nekroz hem de apoptoz eş zamanlı gerçekleştiği düşünülmektedir (53,57). Bununla birlikte birtakım farklılıklar mevcuttur. Örneğin nekroz süreci enerjiden bağımsız iken, apoptoz sadece ATP varlığında, yani fonksiyonel mitokondri varlığında meydana gelir (58,59). Bu nedenle, yüksek mitokondriyal yıkım ve enerji tükenmesi olan dokuda esas olarak hücrel nekroz gerçekleşecektir. Programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptozda, hücre membranı parçalanmaz ve enflamatuvar yanıt ortaya çıkmaz. Nöronlar, daha yüksek hücre dışı glutamat konsantrasyonlarına maruz kaldığında hücrel nekroz oluşur (58). Ayrıca apoptoz veya nekroz oluşumunun hücre içi kalsiyum seviyeleri ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (60,61). Düşük hücre içi kalsiyum konsantrasyonu apoptozu tetiklerken; yüksek hücre içi kalsiyum nekroza yol açabilir. Olgun hücrede apoptozun başlaması için, intraselüler veya ekstraselüler bir tetikleyici gereklidir. Hasar sonrası kalsiyum mobilizasyonu, oksidatif stres ve ATP yokluğu gibi etkenler sonucu hücrel homeostaz bozulur, mitokondri aracılığıyla hücre içi apoptoz başlar (62). Sitokrom c mitokondriyal disfonksiyon sonucu iç mitokondriyal membrandan sitozole geçer. Daha sonrasında sitokrom c, sitozolde dATP ve spesifik bir apoptotik-proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) varlığında kaspaz-9'u aktive eder (63). Ardından Kaspaz-9 da kaspaz-3'ü aktive ederek hücre iskeletinin parçalanması ve endonükleazların aktivasyonlarını sağlar (64) Mitokondriyal hasarla ilişkili intraselüler başka bir yol da apoptoz indükleyici faktör (AIF) yoludur (65-67). Kaspazdan bağımsız bu yol, mitokondriyal zarın bozulması ile aktive olup ardından mitokondriyal membrandan AIF salınımı ile sonuçlanır. AIF salınımı büyük ölçekli DNA parçalanmasına yol açar (boyut olarak 50 – 700 kilo baz çifti). Zhang ve ark. (68) TBH'de AIF yolunun aktive olduğunu belgelemişlerdir. Apoptozun hücre dışı yolağı ise ligandların TNF süper ailesi üyeleri TNFR1 ve Fas/Apo1/CD95 gibi reseptörlerine bağlanmasıyla gerçekleşir. Reseptör ligand bağlanmasıyla TNF-veya Fas ilişkili ölüm domaini içeren trimerik bir kompleks oluşur. Oluşan kompleks kaspaz 8 aktive ederek apoptoz yolağını başlatır (56). TBH'da rolü bulunan Bcl-2 apoptozun önemli bir inhibitörüdür.

TBH sonrası Bcl-2 indüklenmesi kortikal doku kaybını azalttığı gözlenmiştir (69). Bir başka çalışmada da insanlarda TBH sonrası Bcl-2 seviyelerinin beyin dokusunda arttığı raporlanmıştır. BOS'da bakılan Bcl-2 seviyesinin kontrol hastalarına kıyasla TBH'de yaklaşık 4 kat arttığı raporlanmıştır. Ayrıca, BOS'daki Bcl-2 seviyesinin hasta sağkalımı ile ilişkisi olabileceği gösterilmiştir(70). İkincil hasarda nekroz ve apoptozun dışında bir de otofaji görülebilir. Otofajide organellerin ve proteinlerin lizozomal degradasyonu gerçekleşir. Kaspaz inhibisyonu ve mitokondriyal geçirgenlik koşullarında, otofaji genellikle programlanmış hücre ölümü için baskın mekanizmadır. Lai ve arkadaşlarının (71) 2008 yılında yaptığı çalışmada otofajinin inhibisyonu sonucu TBH'de hasarın etkisinin hafiflemesi ilişkilendirilmiştir.

4.2.4. Beyin ödemi

İkincil hasarın ana bileşenlerinden biri de beyin ödemidir. Beyin ödemi sonucu gerçekleşebilen intrakraniyal hipertansiyon gibi son derece yıkıcı süreçler bu patofizyolojik değişimi daha da önemli yapmaktadır. Serebral ödemin sitotoksik veya vazojenik ödem olmak üzere 2 kategoriyi içerdiği uzun zamandır bilinmektedir. Sitotoksik ödem, ozmotik bir gradyana yanıt olarak hücre içi kompartımanında su içeriğinin artması ile karakterize edilir. Şiddetli TBH'de bu durum tipik olarak gözlenen enerji yetmezliği altında ATP'ye bağlı Na⁺/K⁺ pompalarının bozulmasıyla açıklanır. Bu durumda hücre içi iyon artar ve böylece hücre ozmolalitesinde artışa ve hücreye su girişine yol açar. Bu durum esasen intrakraniyaldeki sıvının yer değiştirmesinden ibaret olduğundan sitotoksik ödemin kendi başına beyin su seviyesinde artışa ve intrakraniyal hipertansiyona oluşturamaz. Bununla birlikte hücre içeriğinde değişikliğe yol açarak fonksiyon bozukluğuna neden olur. MRI cihazlarının ilerlemesiyle TBH'nin ilk birkaç saatinde vazojenik ödemin ortaya çıktığı ardından birkaç gün içinde sitotoksik ödem başladığı ve yavaşça arttığı 2 haftaya kadar devam ettiği gözlemlendi (72,73). TBH'den 2-3 gün sonra beyin su içeriğinin maksimuma çıktığı raporlanmıştır (74).



Şekil 4.2.4.1. TBH'de beyin ödemi şeması.

Son yıllarda yapılan araştırmalar KBB'de kapanmanın kademeli olduğu ve hasar sonrası 7 güne kadar geçirgenliğin devam ettiğini göstermiştir (75). Bazı vakalarda TBH sonrasında serebral kan akımı artışının da intrakraniyal hipertansiyona neden olduğu bilinmektedir. Bu akım artışı kontüzyon gibi lokal travma sonrası o bölgedeki glutamat artışı sonucu astrositlerin glutamat kullanımında artışa bu durum da astrositlerin oksidatif enerjiden glikolize geçişine sebep olur. Özellikle şiddetli TBH sonrası yoğun bakım yatışlarında oksidatif metabolizma %50 oranında baskılandığı bilinmektedir (76). Bu süreçte glikoz kullanımındaki artış antioksidan mekanizmasında etkili pentoz fosfat yolu gibi glikoz ihtiyacının olduğu birçok yolağın aksamasına ve prognozun kötüleşmesine neden olur.

4.2.5. Nöroinflamasyon

Nöroinflamasyon, TBH sonrası ortaya çıkabilecek nörolojik bozukluklarda ve nörodejenerasyonda önemli bir rol oynar. Nöroinflamasyon TBH sonrası beyindeki yerleşik mikroglia, astrosit, zayıflamış KBB ile beyne nüfuz eden periferik lökositler ve sitokinler gibi inflamatuvar araçları içeren TBH'nin ikincil hasar süreçlerinden

biridir (77,78). Beyin hasar aldığında ortaya çıkan DAMPS VE PAMPS gibi moleküllerinin TLRs, NLRs gibi organizmaya tehlike sinyalleri gönderen reseptörlere bağlanmasıyla enflamasyon başlar (79). DAMPS tanınmasıyla TNF-a ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler salınır (80). Nöroinflamasyon öncelikle hasarlı hücrelerin onarımından ve istilacı patojenlerden korunmadan sorumlu olan mikrogliyal veya kompleman aktivasyonu ile başlar (81). Kompleman aktivasyonu ayrıca KBB boyunca nötrofil, monosit ve lenfosit akışını artırarak nihayetinde prostaglandinler, kemokinler ve hücre adezyon molekülleri salgılanmasını sağlar (82,83) KBB'deki artış ayrıca plazma proteinlerinin ekstrasvasküler boşluğa akışına neden olur, bu durumda TGF-b aktive ederek nöroinflamasyonu ve astrositlerin yara oluşumunu indükler (84). Mikrogliyal aktivasyonu, TNF-a, IL-1b, IL-6, ve IL-12 gibi KBB zayıflatıcı kemokinlerin salımına neden olduğu gibi aynı zamanda serbest ROS ve nörotoksik moleküller de üreterek sekonder hasarın diğer patolojik süreçlerinin artışına ve enflamatuvar yanıtın artmasına neden olur (77). Mikroglia'nın aktivasyonunun kronik hale gelmesi majör histo-uyumluluk kompleksi sınıf II'nin artışına yol açar ve bu da nörodejenerasyonu artırır. Mikrogliyal aktivasyonunun fenotipik varyasyonları vardır. İnterferon gama varlığı proinflamatuvar (M1) süreçlerin hakimiyetine neden olurken, IL-4 ve IL-13 mikrogliyal farklılaşmayı bir anti-inflamatuvar fenotipe (M2) yönlendirir (85). Literatürdeki tüm bilgilere karşın klinik çalışmalarda nöroinflamasyonun hem yararlı hem de zararlı etkileri olduğu, yüksek dozda antiinflamatuvar ilaç kullanımının kötü sonuçlara yol açtığı görülmüştür (86,87).

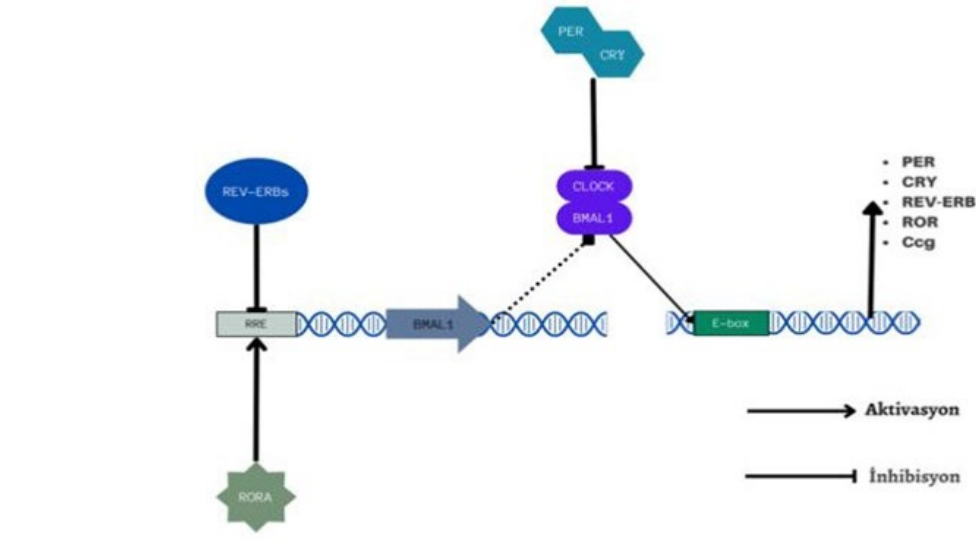
4.3. Sirkadiyen Ritim

Sirkadiyen (circa=yaklaşık, diem=gün) ritim organizmanın sahip olduğu endojen kaynaklı biyolojik saat sistemi tarafından üretilir. İnsanlar dahil olmak üzere dünyadaki hemen hemen tüm yaşam, günlük değişiklikleri tahmin etmek için dahili bir biyolojik zamanlayıcıya sahiptir. Organizmaların bu tür saate sahip olması, gündüz/gece döngüsünün çeşitli taleplerine karşı kendi fizyoloji ve davranışlarını önceden optimize etmesini sağlar. Hipokrat ve Galen gibi tıbbın öncüleri ateşle ilgili 24 saatlik döngüsellğe dikkat çekmiştir. Yüzyıllar boyunca bitki ve hayvanlarda gözlenen 24 saatte bir devridaim eden bu ritmik seyir doğanın bir gerçekliği olarak kabul edildi. Bu görüş,1729 yılında Jean Jacques d'Ortous de Mairan'nın mimoza

bitkisi dolap gibi karanlık bir ortamda tuttuğunda dış ortamdaki ritmikliği göstermesiyle değişmeye başladı.1930 ortalarına gelindiğinde Bünning ilk defa bitkiler için biyolojik saat terimini kullanarak endojen bir mekanizmadan bahsetti. Ardından 1950'lere gelince Colin Pittendrigh yaptığı çalışmalar sonucunda sirkadiyen ritmin temel özelliklerini tanımladı: Tüm sirkadiyen ritimler endojen kaynaklı yaklaşık 24 saatlik periyoda sahip biyolojik (biyokimya, fizyoloji ve davranış) süreçlerdir. Bu süreçler dış çevreden gelen (zeitgeber) birtakım uyarıcılar aracılığıyla senkronize olabilir. Bu çalışmalardan ilham alan Jeffrey Hall, Michael Rosbash ve Michael Young ilk saat geni Period keşfederek 2017 Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülüne layık görülmüştür. Period genin keşfinden bu yana hücresel düzeyde biyolojik saati oluşturan birçok transkripsiyon faktörü (TFs) memelilerde keşfedilmiştir.

4.3.1. Sirkadiyen ritmin moleküler mekanizması

Sirkadiyen ritim, vücudun hemen hemen tüm hücrelerinde bulunan saat benzeri bir mekanizma tarafından üretilir. Sirkadiyen zaman işleyişinin temel birimi hücredir. Hücrelerdeki gen ekspresyonundaki salınımlar sirkadiyen ritmin ana gücünü oluşturur (88,89). Ritmik ekspresyon olan bu genlerin çoğu dokuya özgü olmasına karşın, bu genlerin ritimlerinin altında hücreler arasında ortak bir saat mekanizması vardır. En genel anlamda bu hücresel saat mekanizması, içinde "saat" genlerinin kendi işlevlilerini kendilerinin oluşturduğu protein ürünleri tarafından bastırıldığı birbirine kenetlenmiş moleküler döngüler şeklinde çalışır. Daha spesifik olarak, memelilerdeki sirkadiyen saatler, kendi kendini düzenleyen transkripsiyonel-translasyonel geri besleme döngüleriyle oluşturulan son derece korunmuş bir moleküler mekanizma olan çekirdek saat genlerin (core clock gene) ritmik bir şekilde ekspresyonuna dayanır. Hücresel düzeyde bu otonom sistem birbirine bağlı negatif geri besleme döngülerinden oluşur.



Şekil 4.3.1. Sirkadiyen moleküler saat mekanizması.

Bu sirkadiyen mekanizmanın transkripsiyon faktörü olan BMAL1 (Brain and muscle ARNT-like protein 1) ve BMAL1'in heterodimer partneri olarak görev alan CLOCK (Circadian locomotor output cycles kaput) veya NPAS2 (Neuronal PAS domain containing protein 2) moleküler seviyede Period (PER1, PER2 ve PER3) ve Crytochrome (CRY1 ve CRY2) genlerinin transkripsiyonlarını kontrol etmektedir (90). PER ve CRY proteinleri negatif geribildirim döngüsüne bağlı olarak BMAL1/CLOCK transkripsiyon faktörlerinin aktivatör etkinliğini baskılamaktadır. Bu sayede sirkadiyen ritim proteinlerinin ifadeleri ritmik olarak artıp azalmaktadır. Ayrıca CLOCK ve BMAL1 heterodimer kompleksi Rev-Erb α/β 'nın transkripsiyonunu aktive ederek Rev-Erb α protein seviyesini de arttırmaktadır. Bunun sonucunda artan Rev-Erb α/β BMAL1'in promotör bölgesine bağlanır ve transkripsiyonel baskılama özelliği göstererek BMAL1'i transkripsiyonunu inhibe eder(91,92). Çekirdek saat genlerinin ritmik olarak çalışmasıyla dokularda saat kontrollü genler adı verilen bir dizi çıktı genlerin ekspresyonu olur. Oluşan saat kontrollü genler, dokuya özgü düzenleyici ve metabolik faaliyetlerde yer alan proteinleri kodlar. Genom çapında transkripsiyon analizleri, saat kontrollü genlerin dokudan dokuya yalnızca yaklaşık %10 örtüşüğünü ve organlarda farklı tepe faz dağılımlarına sahip olduğunu göstermektedir.

Sirkadiyen ritmin organizma düzeyinde, çevresel gündüz/gece döngüsüne senkronizasyonu ışık, beslenme ve sıcaklık gibi dış düzenleyiciler aracılığıyla sağlanır. Memelilerde ışık, bir retina girdisi aracılığıyla hipotalamustaki suprakiazmatik çekirdeğini etkiler. Hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeğinde yer alan saatin, vücudun her yerinde bulunan hücresel saatleri hiyerarşik bir sistemle rehberlik ettiğine dair önemli kanıtlar mevcuttur. SKÇ optik kiazmanın üzerinde üçüncü ventrikülün (kemirgenlerde) her iki yanında yaklaşık 10.000 hücreye sahiptir. Yapılan çalışmalarda hayvanlarda bu hücrelerin ablasyonu sonucunda sirkadiyen ritmin geri dönüşümsüz olarak kaybedildiği gözlemlendi. Bununla birlikte, ablasyon sonrası SKÇ içeren başka bir beyin dokusu transplantasyonu gerçekleşirse ritmik aktivitenin geri döndüğü ve geri dönen ritmik aktivitenin periyodunun ise graft SKÇ'nin genotipi olarak değiştiği keşfedildi. Yani eğer konakçının sirkadiyen ritmi 24 saat periyoda sahipken donörünki 20 saat ise doku transplantasyonu sonrası konakçının periyodu 20 saat olarak değişir.

İnsanlar üzerinde yapılan epidemiyolojik, genetik ve/veya deneysel çalışmalar hem sağlığın korunmasında hem de akut patolojilerin düzenlenmesinde günlük/sirkadiyen ritmin rolünü desteklemektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, uyku yoksunluğu olan vardiyalı çalışanlarda, vücut kitle indeksi ve insülin direnci arttığı ve metabolik sendrom riskini daha fazla olduğu gösterdi. Vardiyalı çalışma veya sosyal jetlag (çalışma günleri ve tatil günleri arasında uyku saatlerinin yanlış hizalanması) tarafından indüklenen günlük/sirkadiyen uyumsuzluk, kardiyovasküler hastalık (KVH), diyabet, obezite ve çeşitli kanser tipleri içeren birçok kronik hastalığın riskinin arttırmaktadır (93–95). Bu hastalıklardan meme kanseri ve tip 2 diyabet üzerine yapılan genomik çalışmalar sirkadiyen ritmi düzenleyen gen varyantları ile hastalıkların etiyolojisinin ilişkili olduğu bulunmuştur (94,95). Desenkronizasyonun kronik yan etkilerine ek olarak akut hastalıkların patofizyolojisi de sirkadiyen ve/veya diurnal ritim tarafından düzenlenebilir. Miyokardiyal iskemi (96,97) ve enfarktüs (98) gibi kardiyovasküler olaylar olma ihtimali hastalar için sabahları daha yüksek saptanmıştır. Tofler ve ark. (99) bu risk artışının arteriyel basınçtaki sirkadiyen/gece-gündüz değişiklikleri ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Sabahları enfarktüs riskinin artışına ek olarak enfarktüs boyutlarının da büyük olması lökositlerin ritmik

infiltrasyonu ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür (100). Böylece sirkadiyen ritmin çeşitli hastalıkların hem ortaya çıkmasında hem de semptomların şiddetlenmesinde ilişkisi olduğu gösterilmektedir.

4.4. MSS ve Sirkadiyen Ritim

Sirkadiyen ve/veya günlük ritimler akut MSS hastalıklarının patogeneğinde rol oynar. Bu akut yaralanmalar doğrudan-ani doku hasarı (birincil yaralanma olarak tanımlanır) ve birincil yaralanmaya yanıt gecikmiş hasar (ikincil yaralanma) oluşturur. Literatürde iskemik inme, travmatik beyin hasarı (TBH) ve omurilik hasarı (SCI) gibi akut MSS patolojilerinde birinci ve ikinci hasarın rolü belgelendi (89,101,102). Çeşitli biyolojik süreçlerin günlük/sirkadiyen ritimleri, akut yaralanmalarının her iki hasar aşamasını da modüle edebileceği düşünülebilir. Bu sebeple birinci yaralanmanın sebep olduğu doku hasarı travma anındaki diurnal/ sirkadiyen salınımın etkilediği hücre duyarlılığından etkilenebilirken; katlanmamış protein yanıtı, oksidatif stres yanıtı, DNA hasar yanıtı gibi hücresel hasarın farklı diurnal/sirkadiyen durumu ikincil hasarı etkileyebilir. Klinik veriler intraserebral ve subaraknoid kanama (SAK) gibi akut serebrovasküler yaralanmaların başlangıç şiddeti ve prognozunun diurnal ritmi belgelenmiştir (103). Akut MSS hasarının patogeneğinde sirkadiyen saat yolunun rolüne ilişkin araştırmalar için bariz bir başlangıç noktası, hasarın akut/subakut fazları sırasında saat yolu bileşenlerinin ekspresyonunun/aktivitesinin analizidir. Örneğin, sıçanlarda küresel iskemiği takiben 6 saat kadar kısa bir sürede PER2'nin hipokampal ekspresyonundaki günlük salınımlarının tersine çevrildiği gözlemlendi (104). Bir başka çalışmada da lateral sıvı perküsyon modellemesiyle oluşturulan TBH'de, yaralanmayı takiben sırasıyla 20 veya 44 saatte SCN nöronlarında Cry1 veya Bmal1 mRNA'nın ekspresyonun arttığı gözlemlendi (105). Aynı çalışmada hipokampustaki Bmal1, Cry1 ve Per1 ekspresyonunda azalma gözlemlendi. Benzer şekilde, sıçanlar SCI'den 2 gün sonra hasarlı omurilik dokusunda Bmal1, Cry1, Per2 ve Nr1d1 mRNA seviyelerinde azaldığı gözlemlenmiştir (106). Farelerde SCI'den 6 ve 24 saat sonrası Bmal1 mRNA ekspresyonu yükselirken, 12 ve 24 saatlerde düşük Bmal1 protein seviyeleri gözlemlenmiştir. Bmal1 ve Nr1d1 mRNA seviyelerinin deneysel otoimmün ensefalomyelit modellerinde 14 gün sonra azaldığı raporlanmıştır (107). Tüm bu

çalışmalar MSS yaralanmaları sonrasında sirkadiyen saat mekanizmasının regülasyonunun bozulduğunu göstermektedir.

Literatürde hasarın gerçekleştiği zamanın hasar sonrası prognozu etkilediğine dair birçok çalışma mevcut. Gün saatinin etkileri, fare orta serebral arter tıkanıklığı (MCAO) modellenmesiyle belgelenmiştir. Operasyon saatlerinin farklı olduğu cerrahi deney modelinde operasyondan 72 saat sonra bakıldığında ZT15–21’de gerçekleşen orta serebral arter oklüzyonun ZT3–9 kıyasla hasar hacmi azaldığı daha da ötesinde sekonder hasar gerçekleşmesini sağlayan gecikmiş hücre ölümü ve oksidatif stres ZT15–21’de azaldığı gözlemlenmiş (108). Deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE), miyelin komponentinin immün aracılı akut nöroinflamatuvar hasarı ilişkili olması sebebiyle MS modellenmesinde yaygın kullanılmaktadır. Bir çalışmada EAE modeli oluşturmak için deneklere ZT8 ve ZT20 2 farklı zamanda dış aşılama yapılmış ve ZT8 yapılan aşılama sonrası demiyelinizasyonun daha şiddetli olması ve yüksek pro-inflamatuar sitokin seviyesine sahip olması nedeniyle klinik semptomlarda kötüleştiği raporlandı (109). Bu çalışmaların da gösterdiği gibi hasarın gerçekleştiği zamanın hasarın sonuçları üzerine etkisi vardır.

4.5. Rev-Erb Proteinleri

REV-ERB, iki benzer proteini içeren nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir. Bu proteinler; REV-ERB α ve REV-ERB β ’dir. REV-ERB ismi, REV-ERB α ’nın kodlandığı Nr1d1 geni ERBA proto-oncogene geninin antisensi üzerinde bulunduğundan “reverse-ERB” türetilmiştir (110,111). REV-ERB β ise Nr1d2’den kodlanan REV-ERB α izoformudur. REV-ERB α ve REV-ERB β proteinlerinin DNA’ların spesifik bölgelerine bağlanmasına sağladığı DNA binding domain (DMD), neredeyse tamamı aynı iken ligand bağlanma domaini (LGB)’daki amino asitlerin %71 kadarı benzerdir. Tüm bu benzerliklerle beraber dokularda da benzer ekspresyon paterni göstermektedirler (112). REV-ERB α ’nın silindiği farelerde bazı dokularda REV-ERB β ’nin varlığı REV-ERB α ’nın yokluğunu kompanse ettiği gözlenmiştir (113). Tüm nükleer reseptörlerde olduğu gibi, REV-ERB α/β ’ın da genlerin spesifik genomik bölgelerini tanıması ve bağlamasını iki çinko parmak aracılık eder (114). Bununla birlikte diğer nükleer reseptörlerin çoğundan farklı olarak, REV-ERB’lerin

ligand bağlama alanlarının C-terminal ucundaki karboksi terminal aktivasyon fonksiyonu 2 (AF2) yoktur. AF2 bölgesi transkripsiyonel aktivasyonu sağlayan koaktivatör protein paternlerini tanımasını sağlar. Bu sebeple AF2 yokluğu sebebiyle REV-ERB'lerin transkripsiyon aktivatör rolü olmadığı düşünülmektedir. Bunun yerine, DMD aracılığıyla RORE sekansına bağlanarak transkripsiyonel baskılayıcı gibi davranmaktadır. REV-ERB'lerle aynı genleri hedef alan RORE sekansını tanıyan transkripsiyon aktivasyonu gibi davranan retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) ile REV-ERB'ler arasında dinamik bir etkileşim vardır (115). REV-ERB'lerin DNA bağlanma domaininin RORE bölgesine başarılı bir şekilde bağlanmasıyla nuclear receptor corepressor (NCOR1) proteiniyle etkileşimde bulunur. Sonrasında NCOR1'ler histon deasetilaz 3 (HDAC3) enzimlerini aktive ederek kromatin konsedasyonunu ve deasetilasyon reaksiyonuyla transkripsiyonun baskılanmasını sağlar (116,117). REV-ERB sirkadiyen ritmin hücrel mekanizmasında saat genlerini regüle etmesi göz önüne alındığında bu döngüye bağlı birçok sistemi kontrol altına alabilir ve düzenleyebilir. REV-ERB α 'yı APOC-III gen ekspresyonunun regüle ederek lipid metabolizmasında rolü gösterildi. Bir başka çalışmada yüksek miktarda REV-ERB insülin sekresyonunu arttırarak glikoz konsantrasyonunu düşürdüğü ve böylece tip 2 diyabette tedavi için bir hedef olabileceği düşünüldü. REV-ERB agonistlerinin kullanımının lipojenik genler Srebf1 ve Fasn'ın ekspresyonunu azalttığı ve yağ asidi taşıyıcı gen Fatp'nin transkripsiyonel seviyelerini artırdığı gözlemlenmiştir. Kaslarda Rev-Erb' α aktive edildiğinde, mitokondri sayısında artış ve daha yüksek bir oksidatif kapasiteye olanak sağlar (118). Bu çalışmalar REV-ERB'nın metabolizma üzerinde etkisini göstermektedir.

4.5.1. RevErb ve İnflamasyon

Birçok immün hastalığın sirkadiyen paterni olduğu bilinmekle birlikte literatürde REV-ERB'lerin inflamasyon üzerinde regülasyonu çalışılmıştır. REV-ERB makrofajlarda Tlr4 baskılayıp IL-6 üretimini azalttığı ve bu sayede inflamatuvar yanıtı durdurduğu bulunmuştur (119). Başka bir çalışmada inflamasyon ortamında REV-ERB disfonksiyonu Tlr4 gen ekspresyonunu artırdığı raporlanmıştır (120,121). Tlr4 aynı zamanda TBH'nin inflamatuvar sürecinde rol aldığı bilinmektedir. Literatürdeki çalışmalar TLR4 eksikliği olan farelerde kontrollere kıyasla inflamatuvar

genlerin ekspresyonunda azalma ile daha küçük beyin lezyonları gözlemlendi ayrıca TBH'nin ardından, bir TLR4 bloke edici olan VGX-1027'nin ödemde azalmaya neden olmuştur (122,123). TBH ve REV-ERB ayrı ayrı yapılan bu çalışmalar REV-ERB'nin TBH üzerinde etkisinin olabileceğini desteklemektedir. Otoimmün hastalıklarda etkin role sahip TH17 hücreleri IL17 salgılayarak konakçı savunmasında görevli proinflamatuvar immün hücreleridir. Multiple skleroz için yapılan çalışmalarda bu hücrelerin omuriliğin inflamatuvar demiyelizasyonunda rol aldığı gösterilmiştir (124). REV- ERB ile ilgili çalışmalarda ise REV-ERB silinmesiyle oluşturulan farelerde IL17 ekspresyonunun arttığı ve TH17 aracılı immün hastalıkların semptomlarının kötüleştiği bildirilmiştir (125).

4.5.2. RevErb ve Nöronal uyarılma

Nöronal uyarılmanın ve eksitotoksitenin TBH sonrası ikincil hasarda etkin rolü olduğu bilinmektedir. 2021 yılında yapılan bir çalışmada REV-ERB proteininin epilepsili hastaların beyin dokularında ifadesinin arttığı görüldü. Farelerde Rev-erba'nın ablasyonunun veya farmakolojik inhibisyonunun, akut ve kronik nöbetlere karşı nöronal duyarlılığı azalttığı, Rev-erba'nın aktivasyonunun da farelerde nöbet duyarlılığını arttırdığı bulunmuştur (126).

5. MATERİYAL METOT

5.1. Deney Grupları

Bu tez kapsamında Rev-Erb α ve Rev-Erb β 'nin akut dönem travmatik beyin hasarında rolünün incelenebilmesi için farelere soğukla indüklenen beyin hasarı modeli uygulandı. Bu model travmatik beyin hasarı için yaygın kullanılan bir hayvan modelidir ve patofizyolojik kaskadlar açısından travma ile önemli benzerlikler paylaşmaktadır (127). Çalışmanın belirlenen hedeflerine ulaşabilmesi için 8 deney grubu oluşturuldu. İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM) tarafından temin edilen fareler aşağıda belirtilen gruplara rastgele dağıtıldı. Oluşturulan deney grupları;

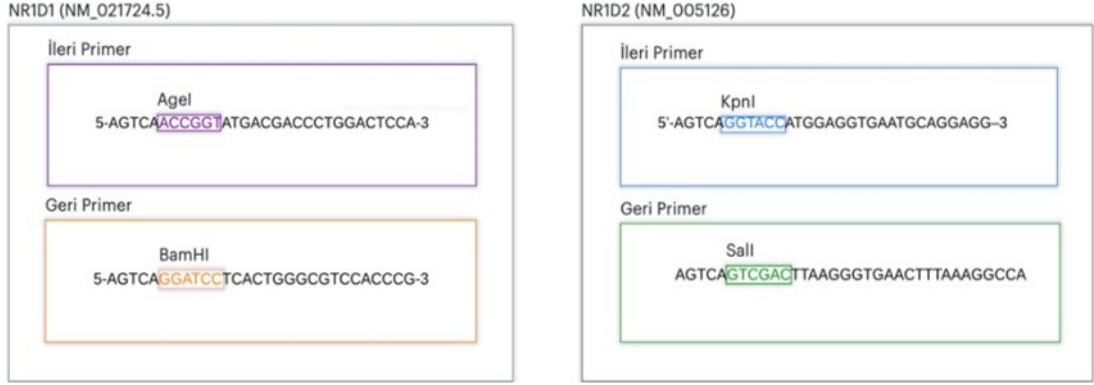
- **Lv-GFP:** Moleküler klonlamaların yapıldığı Lenti-Ef1 α -GFP-2A-Puro vektörünün fare beyinde herhangi bir etkisinin olup olmadığının araştırılabilmesi için oluşturulmuş deney grubudur.
- **Lv-RevErb α :** Lenti-Ef1 α -GFP-2A-Puro vektörünün içerisine klonlanmış Rev-Erb α 'nın protein kodlama bölgesi sayesinde Rev-Erb α aktivasyonunun etkilerini incelemek için oluşturulmuş deney grubudur.
- **Lv-RevErb α/β :** Lenti-Ef1 α -GFP-2A Puro vektörünün içerisine klonlanmış Rev-Erb β 'nin protein kodlama bölgesi sayesinde Rev-Erb β aktivasyonunun etkilerini incelemek için oluşturulmuş deney grubudur.
- **Lv-RevErb α :** Lv-RevErb β : Hem Lv-RevErb α ile Rev-Erb β aktivasyonunun hem de Lv-RevErb α ile Rev-Erb β aktivasyonunun beraber göstermiş olduğu etkilerin incelenebilmesi için oluşturulmuş deney grubudur.
- **ScRNA:** İnhibisyon plazmidinin fare beyinde herhangi bir etkisinin olup olmadığının analizi için içerisine fare genomunda herhangi bir geni hedef almayan gen dizisi yerleştirilmiş kontrol grubudur.
- **Sh-RevErb α :** Nr1d1 gen dizisini hedef alarak Rev-Erb α protein seviyesinin azaltılmasının hedeflendiği deney grubudur.

- **Sh-RevErb β** : Nr1d2 gen dizisini hedef alarak Rev-Erb β protein seviyesinin azaltılmasının hedeflendiği deney grubudur.
- **Sh-RevErb α + Sh-RevErb β** : Sh-RevErb α aracılığıyla Rev-Erb α 'nın ve Sh-RevErb β aracılığıyla Rev-Erb β 'nin beraber inhibe edildiği deney grubudur.

5.2. Deney Planı ve Deneyin Sonlandırması

Deney hayvanlarının temini ve bakımı İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM) tarafından gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen bu proje kapsamında Rev-Erb α ve Rev-Erb β 'nin akut dönem travmatik beyin hasarında rolünün incelenmesi için akut dönemi ifade eden deney seti tasarlandı. Çalışmada n=8/grup olacak şekilde toplamda 64 adet Balb/c fare kullanıldı. Uygulanan viral transfeksiyonların hedef dokuyu enfekte etmesi yaklaşık olarak 7–10 gün sürmektedir (128,129). Bu nedenle fareler, travmatik beyin hasarının indüklenmesinden 10 gün önce virüs enjeksiyonuna tabi tutuldu. Virüs enjeksiyonlarının 10 gün sonrasında soğukla indüklenen travmatik beyin hasarı modeli 8 gruptaki tüm farelere uygulandı.

Bu tez kapsamında, Rev-Erb α ve Rev-Erb β 'nin soğukla indüklenen travmatik beyin hasarının akut döneminde etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Rev-Erb α ve Rev-Erb β 'nin kan beyin bariyeri geçirgenliğine, beyin ödemine, enfark hacmine, nöronal sağkalım oranına, hücrel sinyal mekanizmalarında görev alan proteinlere etkisinin incelenmesi için travmatik beyin hasarının indüklenmesinden 10 gün önce beyin içi enjeksiyon ile korteks bölgesine Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α + Lv-RevErb β , scRNA, sh-RevErb α , sh-RevErb β , sh-RevErb α + sh-RevErb β enjeksiyonları yapıldı. On gün sonra farelere soğukla indüklenen travmatik beyin hasarı indüklendi. Akut dönem deney grupları hasardan 72 saat sonra %4 izofloran (%30 O₂, geri kalan N₂O) ile derin anestezi uygulanarak sakrifiye edildi. Çıkarılan beyinler, kuru buz üzerinde donduruldu ve analiz için –80°C'de muhafaza edildi. Ayrıca 8 deney grubundan elde edilen korteks dokularına proteomik yöntemi uygulanarak protein analizleri yapıldı.



Şekil 5.3.1. Primer dizilimi ve kesim enzimleri

5.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ile Nr1d1/Nr1d2 genlerinin çoğaltılması

Rev-Erb α 'nın protein seviyesini arttırmak amacıyla insan nükleer reseptör ailesi 1 grup D üyesi 1 (NR1D1) (Rev-Erb α) geninin kodlama bölgesi (NM_021724.5) insan SH-SY5Y hücre hattından üretilen cDNA kullanılarak ileri primer (5'-AGT CAA CCG GTA TGA CGA CCC TGG ACT CCA-3') ve geri primer (5'-AGT CAG GAT CCT CAC TGG GCG TCC ACC CG-3') yardımıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı (**Tablo 5.3.2.1-2**).

Rev-Erb β 'nın protein seviyesini arttırmak amacıyla insan nükleer reseptör ailesi 1 grup D üyesi 2 (NR1D2) (Rev-Erb β) geninin kodlama bölgesi (NM_005126) insan SH-SY5Y hücre hattından üretilen cDNA'sından ileri primer (5'- AGT CAG GTA CCA TGG AGG TGA ATG CAG GAG G-3) ve geri primer (5'- AGT CAG TCG ACT TAA GGG TGA ACT TTA AAG GCC A) yardımıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak çoğaltıldı (**Tablo 5.3.2.1-2**).

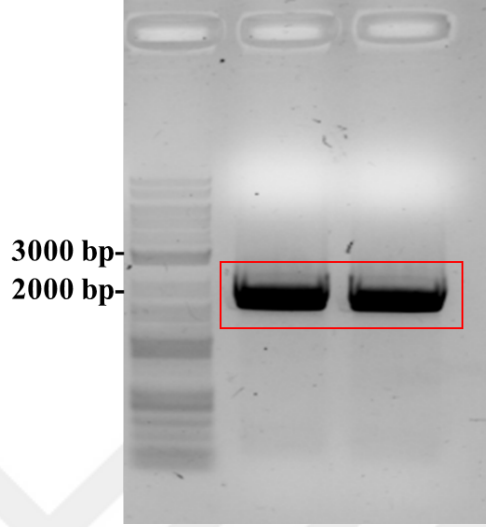
Tablo 5.3.2.1. Nr1d1/ Nr1d2 genleri için PZR hesaplamaları.

Nr1d1/ Nr1d2	Miktar
cDNA	1.0 µl
iProff	0.2 µl
5x iProff Buffer	4.0 µl
İleri Primer	0.4 µl
Geri Primer	0.4 µl
dNTP	0.4 µl
dH2O	13.6 µl
Toplam	20.0 µl

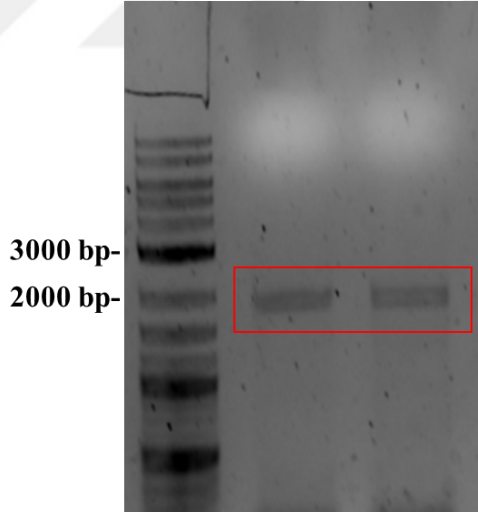
Tablo 5.3.2.2. Nr1d1/ Nr1d2 genleri için PZR termal döngüsü.

Termal Döngü	Süre
•98°C (Başlangıç Denatürasyonu)	30 sn
98°C (Denatürasyon)	10 sn
68-70°C (Bağlanma)	10 sn x34 döngü
72°C (Uzama)	1 dk
72°C (Son Uzama)	2 dk
4°C	∞

PZR reaksiyonu sonrasında elde edilen örnekler 120 Voltta %1'lik agaroz jel (%1 oranında RedSafe (21141, Intron)) içerisine yüklenerek yürütüldü. Daha sonra jel Chemidoc MP görüntüleme sistemi (1708280, Biorad) yardımıyla görüntülendi.



Şekil 5.3.2.1. NR1D1 gen dizisinin PCR ile çoğaltılması ve agaroz jel elektroforez görüntüsü.



Şekil 5.3.2.2 NR1D2 gen dizisinin PCR ile çoğaltılması ve agaroz jel elektroforez görüntüsü.

5.3.3. Nr1D1/Nr1D2 DNA örneklerinin agaroz jelden izolasyonu

Nr1D1 için 1845, Nr1D2 için 1740 baz çiftine denk gelen bant UV lambası yardımıyla jelden kesilip kit (Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, Cat: D4001)

kullanılarak agaroz jelden DNA izolasyon işlemi gerçekleştirildi. Kısaca, agaroz jelin içerisindeki ilgili bant bölgesi kesilerek ependorf içine alınıp tartıldı. Sonrasında jelin ağırlığının üç katı kadar agaroz çözücü tampon solüsyonu eklenerek 55°C’de inkübasyonu gerçekleştirildi. Ardından erimiş jel, kullanılan kit ile gelen zymo-spin kolona aktarılarak santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj aralarında DNA yıkama tamponu ile yıkama işlemleri gerçekleştirilerek jelden izolasyon işlemi gerçekleştirildi. En son distile su ile elüsyon aşaması yapıldı.

5.3.4. Nr1d1/Nr1d2 genlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi

Nr1D1 gen bölgesinden elde edilen DNA örneği ve klonlamanın yapılacağı Lenti-Ef1 α -GFP–2A-Puro vektörü AgeI (FD1464, Thermo Fisher) ve BamHI (FD0054, Thermo Fisher) kesim enzimleriyle 37°C’de kesildi. Kesim işlemleri için yapılan hesaplamalar aşağıdaki tabloda verilmiştir (**Tablo 5.3.4.1.**).

Tablo 5.3.4.1. Nr1d1 ile Lenti-Ef1 α -GFP–2A-Puro vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesim hesaplamaları.

PCR ürünleri için		Boş vektör için	
Nr1D1 DNA örneği	26 μ l	Lenti-CMV-GFP–2A-Puro	5 μ l
10x Fast Digest Buffer	3 μ l	10x Fast Digest Buffer	2 μ l
AgeI	0,5 μ l	AgeI	0,5 μ l
BAMHI	0,5 μ l	BAMHI	0,5 μ l
Toplam	30 μl	dH2O	12 μ l
		Toplam	20 μ l

Nr1D2 gen bölgesinden elde edilen DNA örneği ve klonlamanın yapıldığı Lenti-Ef1 α -GFP–2A-Puro vektörü KpnI (FD0524, Thermo Fisher) ve Sall (FD0644 Thermo Fisher) kesim enzimleriyle 37°C’de kesildi. Kesim işlemleri için yapılan hesaplamalar aşağıdaki tabloda verilmiştir (**Tablo 5.3.4.2.**).

Tablo 5.3.4.2. Nr1d2 ile Lenti-Ef1 α -GFP-2A-Puro vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesim hesaplamaları.

PCR ürünleri için		Boş vektör için	
Nr1D2 DNA örneği	26 μl	Lenti-CMV-GFP-2A-Puro	5 μl
10x Fast Digest Buffer	3 μl	10x Fast Digest Buffer	2 μl
KpnI	0,5 μl	KpnI	0,5 μl
SalI	0,5 μl	SalI	0,5 μl
Toplam	30 μl	dH2O	12 μl
		Toplam	20 μl

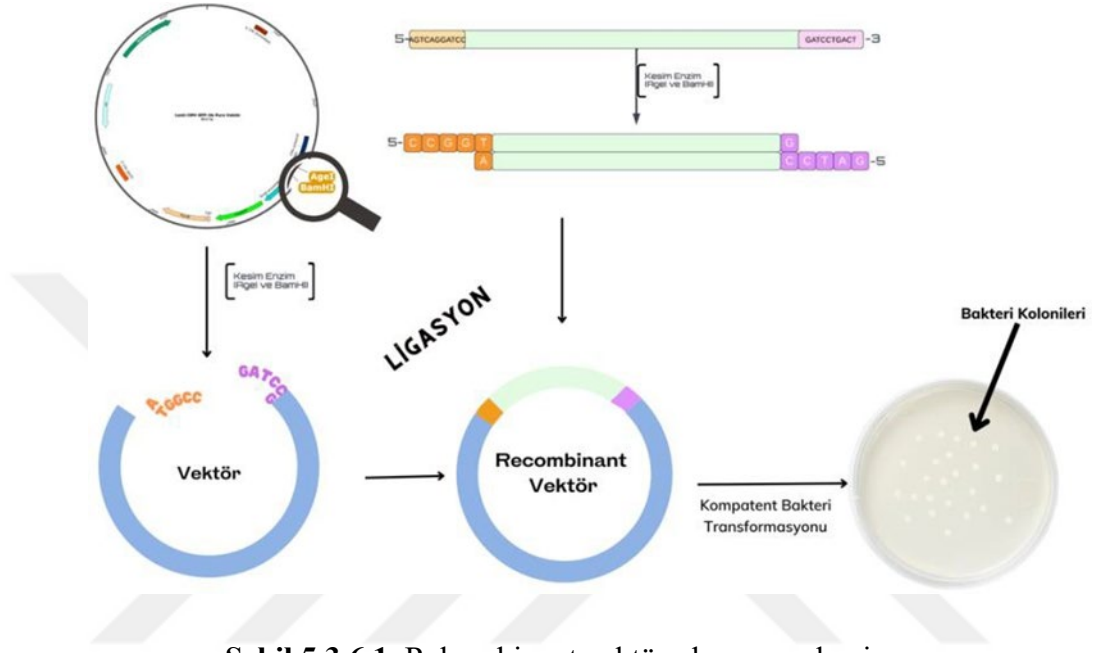
5.3.5. Nr1d1 ve Nr1d2 ürünlerini saflaştırma ve konsantre hale getirme işlemi

Kesim işlemleri gerçekleştirilen örnekler kit yardımıyla DNA temizleme metodu uygulanarak kesim işleminin artıklarından uzaklaştırma ve DNA'yı saflaştırma protokolü uygulandı. Bu aşama için Zymo DNA Clean and Concentrator kiti (D4003T, Zymo Research) kullanıldı. İşlem kısaca şu şekilde gerçekleştirildi; vektör için iki kat, PCR örnekleri için ise beş kat bağlayıcı buffer konularak kitin içeriğindeki kolonlara bu karışım aktarıldı ve santrifüjle kolondaki filtreye bağlanması sağlandı. Ardından yıkama solüsyonu ile artıklardan tamamen arındırıldı. Son olarak elüsyon işlemi gerçekleştirildi ve IMPLEN (IMPLEN, P330, Germany) cihazında ölçümü yapıldı.

5.3.6. Nr1d1/Nr1d2 ürünleri için ligasyon işleminin gerçekleştirilmesi

Konsantrasyonu belirlenen örnekler T4 DNA ligaz (EL0014, Thermo Fisher) enzimi vasıtasıyla PZR ürünlerinin uygun kesim enzimleri ile kesilmiş olan lentiviral vektöre ligasyonu (birleştirme işlemi) sağlandı. Ligasyon işleminden sonra 1 μ l ligasyon ürünü 100 mM CaCl içerisinde kompetent hale getirilmiş 50 μ l Stb13 bakteri karışımının üzerine eklenerek 1 saat süresince kırık buz üzerinde inkübe edildi.

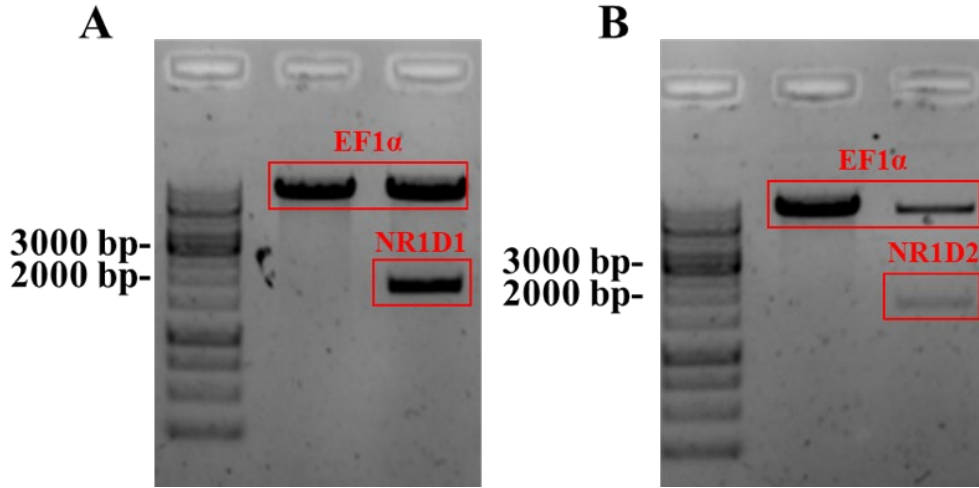
Sonrasında ısı şoku yöntemi kullanılarak klonlama ürünlerinin bakterilerin içine girmesi sağlandı. Bu işlemin ardından bakteriler kanamisin antibiyotiği içeren LB agar plakaların üzerine yayılarak 16 saat süresince 37°C’de inkübe edildi. Ertesi gün kanamisin direncine bağlı olarak ortaya çıkan koloniler alınarak plazmid izolasyonu işlemi kit (D4054, Zymo Research) kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 5.3.6.1. Rekombinant vektör oluşum mekanizması.

5.3.7. Nr1D1/Nr1D2 plazmidlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilerek kontrol edilmesi

Elde edilen plazmidlerin gerçekten istenilen gen dizilerini içerisine alıp almadığının kontrolü için bakterilerden izole edilen kolonilerden elde edilen plazmidler kesim enzimleri ile kesildi. Bu amaçla Rev-Erb α için AgeI ve BamHI kesim enzimleri, Rev-Erb β için ise KpnI ve SalI kesim enzimleri kullanılarak plazmitler kesildi. Elde edilen ürünler %1 agaroz jel (%1 RedSafe) kullanılarak yürütüldü ve sonrasında Chemidoc MP görüntüleme sistemi kullanılarak kolonilerin kontrolleri gerçekleştirildi.



Şekil 5.3.7.1. Nr1D1/Nr1D2 plazmidlerinin jel görüntüleri

5.3.8. RevErb α ve RevErb β inhibisyon plazmidlerinin klonlanması

Rev-Erb α 'nın üretiminden sorumlu olan gen Nr1d1'in ve Rev-Erb β 'nin üretiminden sorumlu olan gen Nr1d2'nin gen düzeyinde susturabilmek için Dharmacon firmasından hazır alınan plazmidler (Nr1d1 mEF1 α -TurboRFP shRNA, glycerol set (Catalog ID: V3SM11244-10EG217166; Kit Components: V3SM11241-234939357, V3SM11241-236584144, V3SM11241-234273745) ve Nr1d2 mEF1 α -TurboRFP shRNA, glycerol set (Catalog ID: V3SM11244-10EG353187 Kit Components: V3SM11241-237715912, V3SM11241-234624373, V3SM11241-235996939)) kullanıldı. Nr1d1 geninin protein üretim bölgesini hedef alan üç farklı plazmid hücre kültürü ortamında denendi. En yüksek protein susturma işlemini gerçekleştiren plazmid seçilerek çalışmalarda kullanıldı. Aynı işlemler Nr1d2 genini hedef alan üç plazmid için de uygulandı.

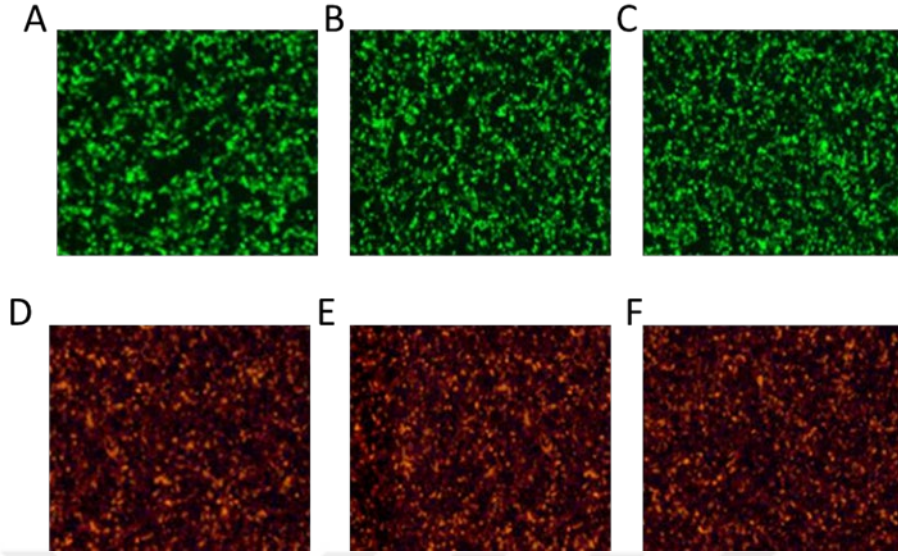
5.3.9. Nr1d1 ve Nr1d2 plazmidlerinin yüksek miktarda üretilmesi

Rev-Erb α ve Rev-Erb β protein seviyesini hem arttırmak hem de azaltmak için yüksek miktarda virüs partikülüne ihtiyacımız vardı. Bu nedenle yukarıda bahsedilen plazmidlerin yüksek miktarlarda üretimi gerekmektedir. Bu amaçla uygun konfirmasyona sahip plazmidler (hücre kültürü ortamında RevErb α ve RevErb β protein seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttıran veya azaltan) bakterilere transformasyon işlemi ile verildikten sonra sıvı besi yeri olan LB-Broth

içerisine bu bakteriler verildi. Bakterilerin sadece istenilen plazmidleri çoğaltabilmeleri için Lenti-Efl α -GFP-2A-Puro vektör içerisine klonlanan örnekler (Lv-RevErb α , Lv-RevErb β ve Lv-GFP) için kanamisin, Lentiviral pLVTHM vektörüne klonlanan sh-RevErb α , sh-RevErb β , paketleme işleminde kullanıldı psPAX ve pMD2.G plazmidleri için ise ampisilin antibiyotiği kullanıldı. Bakteri karışımları 16 saat süresince 37°C’de çalkalayıcı inkübatör içerisinde inkübe edildi. Ertesi gün bakterilerden yüksek ölçekli ve endotoksin içermeyen plazmit izolasyonu sağlayan bir kit kullanılarak (D4203, MaxiPrep Zymo Research) plazmitlerin izolasyonu yapıldı.

5.3.10. Yüksek Miktarda Lentivirüs Üretimi ve Saflaştırılması

Virüs paketlemesi için lentivirüs paketleme çalışmalarında uzun yıllardır rutinde HEK293T hücre hattı kullanılmaktadır. Kültür besiyeri (DMEM, P04-01158, Pan Biotech) içerisine %10 Fetal sığır serumu (FBS; P30-1985, Pan Biotech), esansiyel olmayan amino asitler (P08-32100, Pan Biotech) ve %1 oranında stabil glutamin (Glutamax-I;35050, Gibco) eklenerek HEK293T hücrelerine uygun bir ortam sağlandı. Hücreler %5 CO içeren 37°C inkübatörde (Heracell 150i, Thermo Fisher) inkübe edildi. Hücrelerin çoğalması günlük olarak takip edildi. Takiplerde belli bir doluluk yüzdesine ulaşan hücrelere (yaklaşık 3 günde bir) alt kültürleme işlemleri gerçekleştirildi. Virüs üretimi için 10 cm’lik petri kaplarına 7 milyon HEK293T hücresi ekimi yapıldı. Ertesi gün 7 μ g ekspresyon plazmidini (Lv-Rev-Erb α , Lv-Rev-Erb β , Lv-Rev-Erb α + Lv-Rev-Erb β veya GFP) veya shRNA plazmidini (Sh-Rev-Erb α , Sh-Rev-Erb β , Sh-Rev-Erb α + Sh-Rev-Erb β veya scRNA), 7 μ g psPAX ve 3.5 μ g pMD2.G plazmidini Lipofectamin 3000 (L3000015, Thermo Fisher) transfeksiyon kiti kullanılarak hücrelere verildi. Lipofectamine 3000 ile oluşturulan DNA-lipit kompleksi, hücrelerin üzerine damla damla yavaşça eklenerek 6 saat boyunca %5 CO 37°C inkübatörde (Heracell 150i, Thermo Fisher) inkübasyona bırakıldı. 6 saat sonunda hücrelerin kültür ortamı taze kültür ortamı ile değiştirildi. Transfeksiyondan 24 ve 52 saat sonra kültür ortamları toplanarak 2000 rpm’de +4 °C’ de 10 dk santrifüj edildi. Sonrasında örnekler 0,45 μ m’lik filtrelerden geçirilerek ultrasantrifüj tüplerine (344058, Beckman Coulter) alındı. +4 °C, 100,000 g’de 120 dk santrifüj edilen örneklerden elde edilen pellet dPBS kullanarak çözünmesi sağlandı. Alikotlar halinde -80 °C’de saklandı.



Şekil 5.3.10.1. HEK293T hücre besiyerleri toplandıktan sonra plakalardaki enfekte olmuş hücrelerin mikroskop görüntüsü A) Lv-GFP. B) Lv-RevErb α . C) Lv-RevErb β . D) ScRNA. E) Sh-RevErb α . F) Sh-RevErb β .

5.3.11. Virüs Titrasyonunun Belirlenmesi

İlk olarak 6-kuyucuklu hücre plakasına HCT116 hücre hattının ekimi yapıp ekilen hücrelerin plaka yüzeyini tutması için 1 gece boyunca %5 CO içeren 37°C inkübatörde hücreler bekletildi. Ertesi gün plakaya ekilen HCT116 hücrelerinin üzerine dPBS kullanılarak seri dilüsyonla hazırlanan virüs çözeltileri eklendi. Virüs eklendikten 24 saat sonra hücrelerin bulunduğu sıvı besi yeri yeni taze besiyeriyle değiştirilip 48 saat bekletildi. Virüslerin eklenmesinden 72 saat sonra titrasyon belirleme çalışmaları yapıldı. Bunun için hücreler önce 750 μ l dPBS ile yıkandı. Daha sonrasında 200 μ l %0,25'lik tripsin/ EDTA (25200056, Gibco) kullanılarak hücrelerin plakadan ayrılması sağlandı. Mevcut enzimatik aktiviteyi durdurmak amacıyla 750 μ l hücre kültürü besiyeri hücrelerin üzerine eklendi. Bu işlemden sonra 500 g'de 5 dk süresince santrifüj yapılarak çöktürülen hücreler %1 PFA içeren dPBS içerisinde fiksasyonu sağlanıp tekrar çöktürüldü. Tüm bu işlemlerin sonunda dPBS içerisinde süspansiyon elde edildi. Daha sonra, Akış sitometrisi cihazı (Cell Sorter, BD Influx) kullanılarak GFP pozitif hücreler analiz edilecek ve virüs titrasyonu hesaplandı. Bütün gruplara 1.6×10^8 virüs partikülü 2 μ l 0,1 M PBS içinde beyin içi enjeksiyon ile korteks

seviyesine verildi (129,130). Titrasyon ve hacim belirlenmesinde daha önce yapmış olduğumuz çalışmalar dikkate alınmıştır (128).

5.4. Deney Hayvanı Çalışmaları

5.4.1. Beyin içi enjeksiyon yöntemiyle virüslerin verilmesi

Viral transfeksiyonların hedef dokuyu enfekte etmesi yaklaşık olarak 7–10 gün sürdüğü için travmatik beyin hasarından 10 gün önce farelere virüs enjeksiyonları uygulandı. 8–12 haftalık ve 25–30 gram ağırlığındaki erkek Balb/c fareleri gaz anestezi sistemi ile (%1 İzofluran (N0015A09, Adeka)) (%30 O₂, kalanı N₂O)) anesteziye alındı. Fareler stereotaktik çerçeveye yerleştirildikten sonra bregmanın 2,5 mm lateraline ve 2,5 mm arkasına denk gelen nokta tur aleti vasıtasıyla delindi ve dura yüzeyinin 0,5 mm altındaki korteks bölgesine Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α + Lv-RevErb β , scRNA, sh-RevErb α , sh-RevErb β , sh-RevErb α + sh-RevErb β verildi (131,132). Enjeksiyon sonrasında açılan yara 5,0 ipek dikiş ipliği (S1165, Doğsan, Türkiye) kullanılarak kapatıldı. Enjeksiyondan 10 gün sonra travmatik beyin hasarı operasyonları gerçekleştirildi.

5.4.2. Travmatik beyin hasarı operasyonları

TBH için hayvanlar, yaygın olarak kullanılan bir hayvan modeli olan ve patofizyolojik kaskadlar açısından travma önemli benzerlikler paylaşan soğuk kaynaklı travmatik beyin hasarına maruz bırakıldı (128). Bu modelde, klinikte görülen travmatik beyin hasarı deney hayvanında soğukla indüklenerek oluşturuldu. Hayvanlara %1,5 izofluran (%30 O₂, kalan N₂O) ile anestezi uygulandı. Deney boyunca rektal sıcaklık homeotermik örtü ile 36.5-37 ° C arasında tutuldu. Fareler stereotaktik çerçeveye sabitlendikten sonra nokta tur aleti kullanılarak pariyetal kraniotomi yapıldı (3 mm çapında; dairenin merkezi bregmanın 2,5 mm lateralinde ve 2,5 mm arkasında bulunur). Travmatik hasar, 60 saniye doğrudan dura üzerine yerleştirilen ve çıkartılan sıvı nitrojen soğutmalı bakır prob (uç çapı 2.5 mm) kullanılarak gerçekleştirildi. Daha sonra kafa derisi ipek dikiş ipliği kullanılarak kapatıldı (127). Daha sonra hayvanlar, travma sonrası iyileşme için dinlenme odalarında tutuldu.



Şekil 5.4.2.1. Travmatik beyin hasarı uygulaması. 60 saniye doğrudan dura üzerine yerleştirilen ve çıkartılan sıvı nitrojen soğutmalı bakır prob (uç çapı 2.5 mm) kullanılarak gerçekleştirildi.

5.5. Cryostat Cihazıyla Beyinlerin Kesilmesi

Beyin içi enjeksiyonla virüs verilip travmatik beyin hasarına maruz bırakılan farelerin beyinlerinden ikişer mm aralıklarla 20 µm kalınlığında koronal kesitler pozitif yüklü camlar üzerine alındı. Alınan doku kesitleri 30 dakika süresince 40°C'ye ayarlanmış olan ısıtıcı tabla üzerinde fikse edildi. Fiksasyon sonunda pozitif yüklü camlar immün boyamalar yapıncaya kadar -80 °C dolaplarda saklandı.



Şekil 5.5.1. Cryostat cihazı.

5.6. İmmün Boyamalar

Bu proje kapsamında elde edilen fare beyinlerinden ikişer mm aralıklarla 20 µm kalınlığında alınan koronal kesitlere aşağıdaki immün boyamalar uygulandı.

5.6.1. Apoptotik hücre tayini

İkişer mm aralıklarla 20 µm kalınlığındaki koronal kesitlerde apoptozun son aşamasında gerçekleşen DNA parçalanması esnasında oluşan DNA kırılmalarını tespit eden TUNEL (11684795910, Roche) boyaması kullanıldı. İlk olarak alınan doku kesitleri yıkanmadan önce apoptotik hücrelerdeki DNA kırılma kaybını önlemek için %4 Paraformaldehit (PFA) ile fikse edildi. Fiksasyon işlemini takiben PBS ile yıkanacak olan kesitler oda sıcaklığında keçi serumu (NGS, G9023, Sigma Aldrich) ile bloklandı. TUNEL kiti içinde bulunan enzim ve substrattan elde edilen karışım örnekler üzerine eklenerek 37°C'de 70 dk boyunca reaksiyonun gerçekleşmesi sağlandı. Reaksiyon PBS ile sonlandırıldı. DAPI (D9542, Sigma Aldrich) ile çekirdek boyaması yapıldı. Floresan ışımının solmasını engelleyici kapatma sıvısı (F4680, Sigma Aldrich) kullanılarak lamel ile kesitler kapatıldı. Örnekler LSM 780 (Carl Zeiss) konfokal mikroskopu kullanılarak görüntülendi. Bu ipsilateral korteks

seviyesinden belirlenen 62.500 μm^2 'lik farklı alanlardan TUNEL ve DAPI pozitif hücreler sayılarak analiz edildi (127).

5.6.2. Nöronal sağkalım analizi

Nöronal sağ kalımın belirlenebilmesi için farelerden alınan ikişer mm aralıklarla 20 μm kalınlığında koronal kesitlere NeuN immün boyaması yapıldı. Alınan beyin doku kesitleri %4 Paraformaldehit (PFA) fikse edilip fiksasyon işlemi sonrası kesitler PBS ile yıkandı. Fikse kesitler daha sonra 0,1M PBS içerisine, %0,3 Triton-X100 ve %10 normal keçi serumu hazırlanan solüsyonla oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloklandı. Kesitler 0,1M PBS ile tekrar yıkanıp ardından Alexa Fluor 555 konjuge NeuN Cy3 (MAB377C3, Chemicon) ile 4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün, kesitlere 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile çekirdek boyaması yapılarak floresan ışımının solmasını engelleyici kapatma sıvısı (F4680, Sigma Aldrich) kullanılarak lamel ile kesitler kapatıldı (133). Korteksten belirlenen 62.500 μm^2 'lik farklı alanlardan NeuN ve DAPI pozitif hücreler sayılarak nöronal sağkalım oranı tespit edildi.

5.6.3. Kan beyin bariyeri geçirgenliği analizi

Beyin hasarını takiben oluşan kan-beyin bariyerinin (KBB) bozuklukları, doku kesitlerinde immünohistokimyasal yöntemlerle tespit edilebilen serum proteinlerinin ekstrasvazasyonuna yol açar. Bu sebeple KBB geçirgenliğini IgG ekstrasvazasyon analiz yöntemiyle değerlendirildi. IgG boyaması için Vectostain Elite ABC HRP Reagent, R.T.U. (pk-7100, Vector Laboratories) kiti kullanıldı. Mevcut kitin protokolü uygulanarak boyama işlemleri yapıldı. AxioZoom mikroskobu (Carl Zeiss) altında örneklerin görüntülenmesi sağlandı. Kan beyin bariyeri geçirgenliği Image J programı ile analiz edilecek ve bozulma oranı hesaplandı (133).

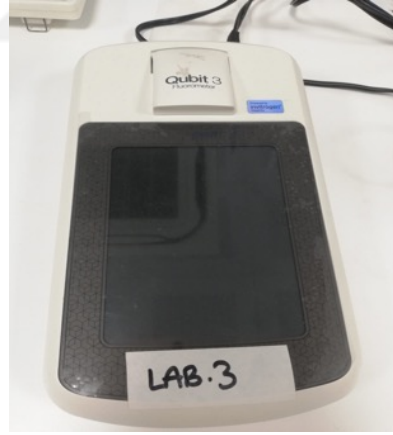
5.6.4. Beyin ödemi ve hasar hacmi

Hasar hacminin değerlendirilmesi için Cresyl violet boyaması yapıldı. Bu sayede hasar sonrası hayatta kalan hücreler boyandı ve hasar alanı tespit edildi. Beyin hasarı ve ödem analizi için deney setlerinden alınan ikişer mm aralıklarla 20 μm kalınlığındaki koronal kesitlere cresyl violet boyaması yapıldı ve Image J programı

kullanılarak ipsilateral ve kontralateral hemisferlerin alanları, hasarın hacmi (mm³) ve beyin ödemi hesaplandı (127,131).

5.7. Western Blot

TBH sonrasında farelerin hasarlı korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden RIPA tampon çözeltisi (R0278-50ML, Sigma Aldrich) kullanılarak protein izolasyonu yapılmıştır. RIPA tampon solüsyonunun içerisine 1:100 oranında proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyli (5782, Cell Signaling) eklenmiştir. Doku örnekleri bu çözelti içinde iyice homojenize edildikten sonra 15 dk süresince buz üstünde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında doku örnekleri +4 °C’de 14.000 rpm’de 15 dk süresince santrifüj edilmiştir. Bu işlemden sonra süpernatant kısmı alınmış ve sonrasında protein karışımının konsantrasyonu Qubit 3.0 Fluorometer cihazı (Q33216, Invitrogen) kullanılarak belirlenmiştir. Qubit 3.0 cihazıyla protein ölçümü yapabilmek için örnekler 1:50 oranında dH₂O aracılığıyla seyreltilmiştir. Sonrasında Qubit protein analiz kiti (Q33211, Invitrogen) kullanılarak örneklerin konsantrasyonları belirlenmiştir.



Şekil 5.7.1. Qubit 3.0 cihazı.

Protein konsantrasyon ölçümünden sonra her örnek için 20 µg konsantrasyonunda protein, 2x Laemmli örnek solüsyonu (1610737, Biorad) ve dH₂O kullanılarak Western blot için örnekler hazırlandı. Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell for Precast Gels içerisine 10x Tris/Glycine/SDS (1610732, Biorad) solüsyonu dH₂O aracılığıyla 1:10 oranında seyreltildikten sonra eklenmiştir.

Bu işlemden sonra Mini-Protean TGX Precast protein jeli (4569033, Biorad) tankın içerisine yerleştirilmiştir. Kuyucuklar iyice yıkandıktan sonra örnekler kuyulara yüklenmiştir. Dikey elektroforez sonrasında proteinler jelden PVDF (Poli-viniliden florür) membrana (162-0174, Biorad) Trans-blot turbo transfer sistemi (1704155 Biorad) kullanılarak aktarılmıştır.



Şekil 5.7.2. Trans-Blot Turbo transfer sistemi.

PVDF membranlar 50 mM Tris-Buffered Saline (TBS-T) (%0.1 Tween içeren tamponlanmış Tris saline) ile hazırlanan %5 yağsız süt tozu (sc-2325, Santa Cruz Biotechnology) ile oda ısısında 1 saat bloklandıktan sonra TBS-T ile yıkanan membranlar bir gece Rev-Erb α (#13418, Cell Signaling), Rev-Erb β (398252, Santa Cruz Biotechnology) veya β -Aktin (4970, Cell Signaling) antikoları ile bir gece süresince inkübe edilmiştir. Ertesi gün PVDF membranlar yıkandıktan sonra birincil antikolarla göre uygun Horseradish Peroksidaz enzimi ekli olan ikincil antikor (31460, Thermo Fisher Scientific) %5 yağsız süt tozu içerisinde uygulanmıştır. Membranlar oda sıcaklığında bir saat süresince ikincil antikolar ile inkübe edildikten sonra WesternBright ECL kiti (K-12045-D20, Advasta) yardımıyla ve Chemidoc MP görüntüleme sistemi (1708280, Biorad) kullanılarak proteinler görüntülenmiştir.



Şekil 5.7.3. Chemidoc MP görüntüleme sistemi.

Western Blot sonunda elde edilen membran görüntüleri bilgisayar programı (Image J; National Institute of Health) yardımıyla yoğunluk farkına göre analiz edilmiştir.

5.8. Proteomik Analizler

5.8.1. FASP (Filter-Aided Sample Preparation) protokolü

Filtrasyon temeliyle çalışan bu ürünle, protein denatürasyonu için kullanılan ürenin fazlası veya kütle spektrometresinde girişime neden olan SDS deterjanın gibi alt akım proseslerde oluşan veya kullanılan kimyasallar ortamdan uzaklaşması sağlandı. Bu amaçla 50 µg protein örneğinin üzerine 50 mM amonyum bikarbonat ortamında 50:1 veya 100:1 oranında tripsin enzimi ile muamele edildi. Sonrasında örnekler 37 °C'de 16 saat süresince inkübe edildi. Ertesi gün 14,000 g'de 10 dk süresince santrifüj edilip elde edilen peptitler liyofilizatör cihazı kullanılarak liyofilize hale getirildi. Bu aşama sonrasında liyofilize halde bulunan peptitler istenilen miktarda %0,1 konsantrasyonunda formik asit ile çözdürülüp son konsantrasyonu 100 ng/µL olacak şekilde hazırlanmıştır.

5.8.2. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (Lc-Ms/Ms) Analizi

FASP protokolü kullanılarak elde edilen peptitler SYNAPT[®]GS2-Si yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi ile birleştirilmiş ACQUITY UPLC M sınıfına yüklenerek hesaplandı.



Şekil 5.8.2.1. LC-MS/MS cihazı.

Kolonlar %97 mobil faz A (%0,1 FA içeren UHPLC'li su) ve sıcaklık 55 oC' ye ayarlandı. Peptitler analitik kolona trap kolondan (Symmetry C18, 5 µm, 180 µm i.d. × 20 mm, Waters), analitik kolona 90 dk dereceli ayrıştırma ile trap kolonundan (CSH C18, 1,7 µm, 75 µm i.d. × 250 mm, Waters) ayrıştırıldı. Bu ayrıştırma işlemi %0,1 FA (h/h) içeren, gradyeni %4'den %40'a olan ACN ile dakikada 0,400 µl akış hızıyla yapılması sağlandı. MS ve MS/ MS taramalarının pozitif iyon modu ile 0,7 saniyelik döngülerle taramalar yapılarak on volt düşük çarpışma enerjisi ve 30V yüksek çarpışma enerjisi olarak ayarlandı. İyonlar, iyon hareketlilik ayrımı ile ayrıştırıldı. Dalga hızı, tam IMS döngüsü boyunca 1000'den 55 m/s' ye yükseltildi. Hareket

kabiliyeti için serbest bırakma süresi 500 μ s, trap yüksekliği 15 V olarak ayarlandı. IMS dalga gecikmesi, kapanın serbest bırakılmasından sonra hareketlilik ayrımı için 1000 μ s idi. Prekürsör iyon ön seçimi olmaksızın, 50–1900 m / z aralığındaki tüm iyonlar çözünürlük modunda parçalanması sağlandı. Waters marka quadropole-TOF hibrid analizörlere sahip aynı zamanda gaz ortamında iyonları alıkoymak suretiyle peptit ayrımına sıvı kromatografisinden farklı prensiple katkı sağlayan iyon mobilite özelliğine sahip yüksek çözünürlüklü Synapt G2-Si cihazı ile her biri 90 dakika süren ve yukarıda bahsedilen rutin analizlerde kullandığımız protokol uygulandı. Buradan elde edilen ham data PLGS Threshold Inspector ve PLGS 3.0.1 biyoinformatik araçları kullanılarak protein tayini yapıldı. Fazla sayıda örneğin toplu halde karşılaştırmalı analizli için Progenesis QIP yazılımı kullanılarak gerekli istatistiksel hesaplamalar da yapılarak gruplar arasında ekspresyonu farklı olan proteinler tespit edildi (134–137).

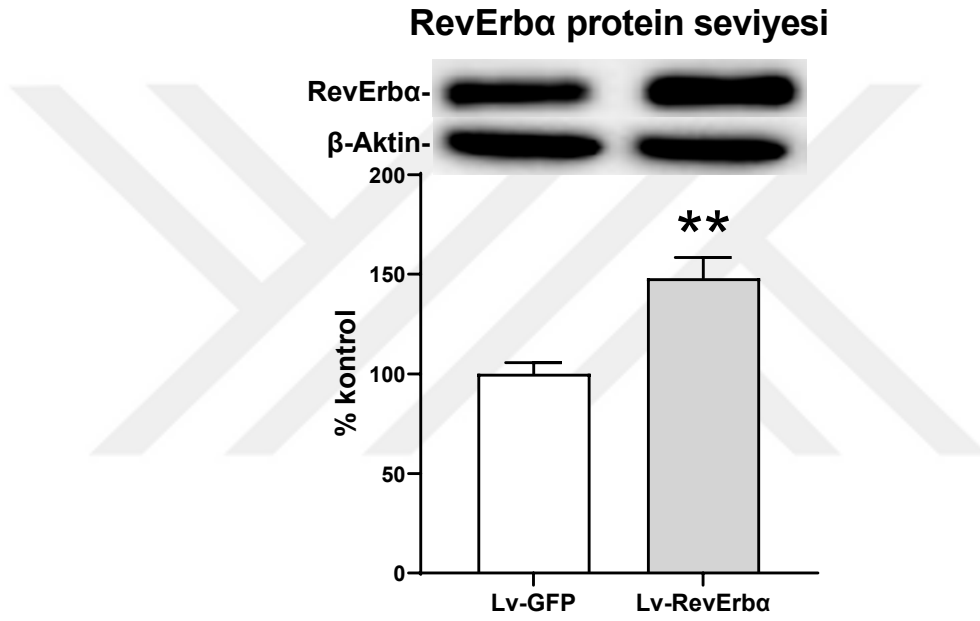
5.9. İstatistiksel Analizler

Gruplar arasındaki (Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α + Lv-RevErb β , scRNA, sh-RevErb α , sh-RevErb β , sh-RevErb α + sh-RevErb β veya Kontrol) farklılıkların belirlenmesi için istatistiksel analizler SPSS programı (Ibm) kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki farklar SPSS programındaki tek yönlü (one-way) varyans analizi (Analysis of varitaion, ANOVA) kullanılarak, post-hoc testinde en düşük anlamlı farklılık testiyle (least significant difference, LSD test) analiz edildi. Ayrıca, LC-MS/MS verileri için anlamlılık bağımsız örneklem t-testi (*independent samples t test*) yapılarak hesaplandı. Bütün değerler ortalama \pm standart sapma olarak verildi, *p<0,05 ve **p<0,01 istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi (133,138).

6. BULGULAR

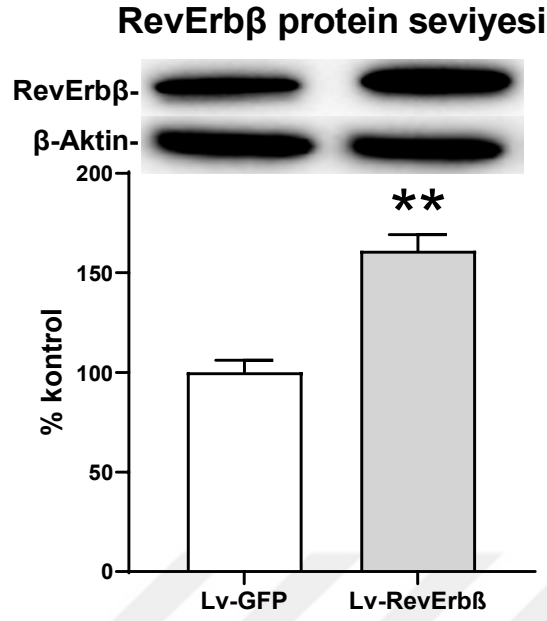
6.1. Lentivirüs Etkinliğinin Western Blot Yöntemiyle Gösterimi

Tez çalışması kapsamında üretilen lentivirüslerin fare korteks seviyesinde RevErb α veya RevErb β protein ifadesi üzerine etkilerini araştırmak için beyin içi enjeksiyon yapılan hemisferden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemiyle RevErb α veya RevErb β protein seviyeleri analiz edilmiştir.



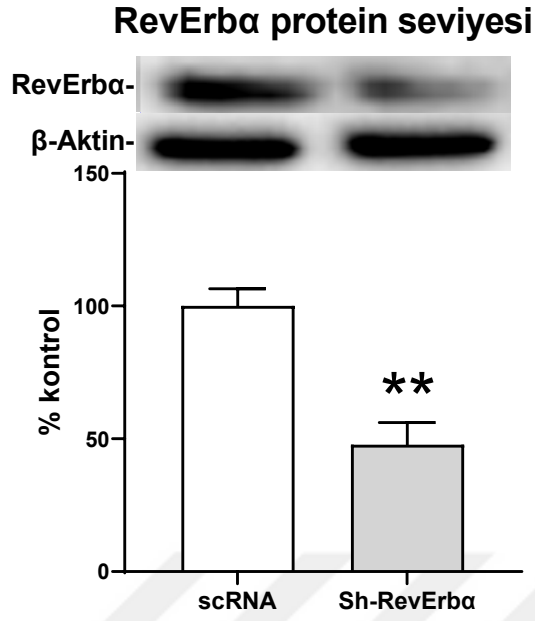
Şekil 6.1.1. Lv-GFP ve Lv-RevErb α 'nın RevErb α protein ifadesi üzerine etkisi. Veri ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p<0.01$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Lv-RevErb α uygulamasının kontrol grubuna (Lv-GFP) RevErb α protein ifadesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p<0.05$, bağımsız örneklem t-testi) artırdığı tespit edilmiştir.



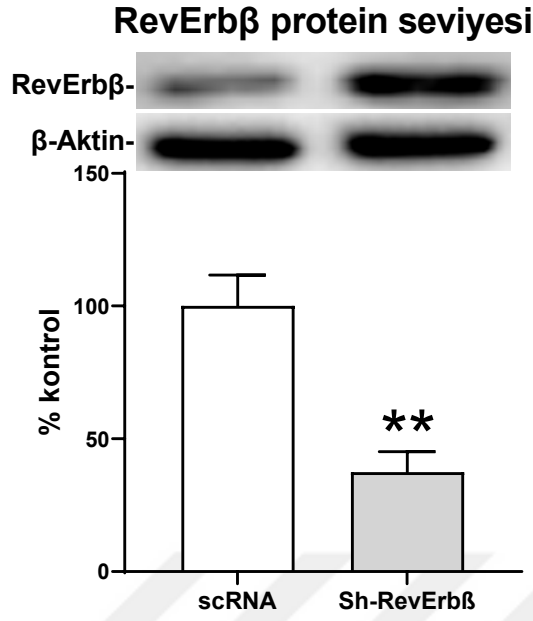
Şekil 6.1.2. Lv-GFP ve Lv-RevErb β 'nın RevErb β protein ifadesi üzerine etkisi. Veri ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Lv-RevErb β uygulamasının kontrol grubuna (Lv-GFP) RevErb β protein ifadesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p < 0.05$, bağımsız örneklem t-testi) artırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 6.1.3. scRNA ve Sh-RevErba'nın RevErba protein ifadesi üzerine etkisi. Veri ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

RevErba protein ifadesini baskılamak için üretilen Sh-RevErba'nın kontrol grubuna (scRNA) kıyasla RevErba protein ifadesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p < 0.05$, bağımsız örneklem t-testi) artırdığı tespit edilmiştir.

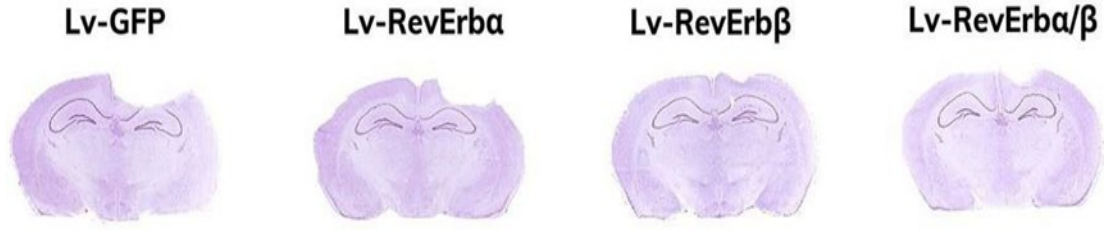


Şekil 6.1.4. scRNA ve Sh-RevErb β 'nın RevErb β protein ifadesi üzerine etkisi. Veri ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ** $p < 0.01$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

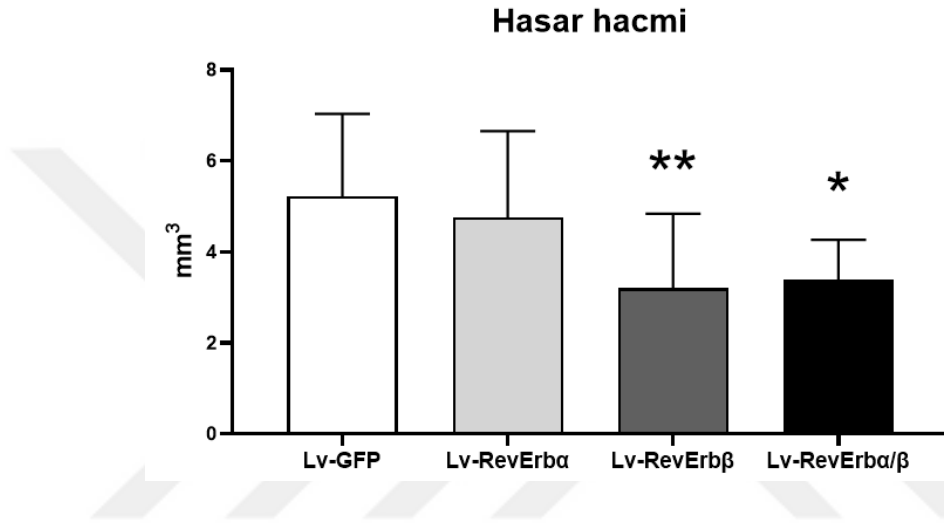
RevErb β protein ifadesini baskılamak için üretilen Sh-RevErb β 'nın kontrol grubuna (scRNA) kıyasla RevErb β protein ifadesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p < 0.05$, bağımsız örneklem t-testi) artırdığı tespit edilmiştir.

6.2. Hasar Hacmi ve Ödem Analizi

Travmatik beyin hasarı operasyonlarından 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyinleri cryostat yardımı ile 2 mm aralıklarla 20 μ m kalınlıkta kesildikten sonra beyin hasar hacmini hesaplamak için cresyl violet boyaması yapılmıştır (Şekil 6.2.1. ve Şekil 6.2.3.). Boyama yapılan kesitlerden bilgisayar programı (Image J) yardımıyla hasarlı alanlar ve toplam beyin alanları ölçülerek infarkt hacmi (Şekil 6.2.2. ve Şekil 6.2.4) ve ödem (Şekil 6.2.5. ve Şekil 6.2.6) hesaplanmıştır.



Şekil 6.2.1. Cresyl violet boyamasıyla protein ifade artışı gerçekleştirilen grupların gösterimi.

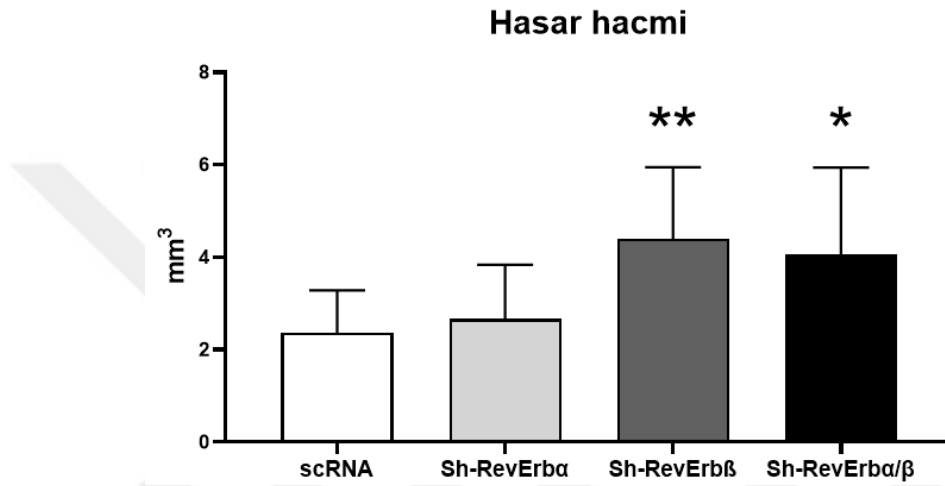


Şekil 6.2.2. TBH sonrası protein ifade artırımı yapılan gruplarda (Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α + Lv-RevErb β grupları) hasar hacmi analizi. Veri ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Hasar hacimleri sırasıyla Lv-GFP grubunda 55.53 ± 16.74 mm³, Lv-RevErb α grubunda 52.52 ± 14.87 mm³, Lv-RevErb β grubunda 31.99 ± 16.44 mm³ ve Lv-RevErb α + Lv-RevErb β grubunda 33.91 ± 8.71 mm³ olarak hesaplandı (Şekil 6.2.2.). Lv-RevErb β grubunun Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede hasar hacmini azalttığı görüldü. Lv-RevErb α + Lv-RevErb β grubunun da Lv-GFP grubuna istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede hasar hacmini azalttığı görüldü. Lv-RevErb α grubunun Lv-GFP grubuna göre İstatistik olarak anlamlı bir değişim görülmedi.

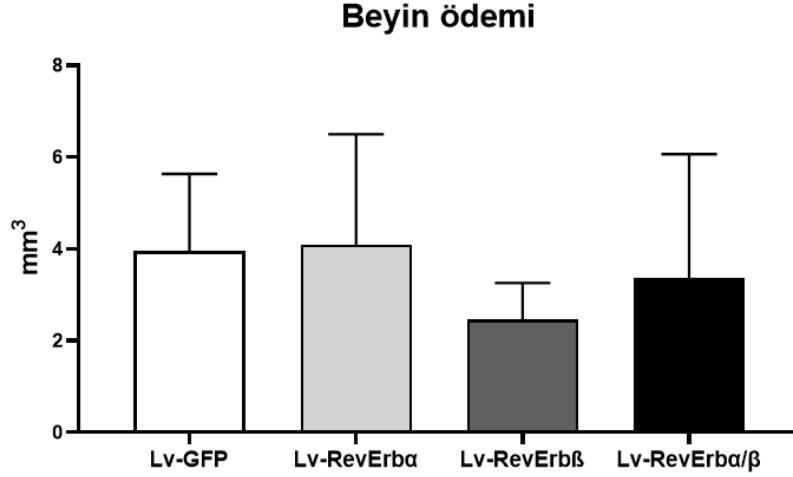


Şekil 6.2.3. Cresyl violet boyamasıyla protein inhibisyonu gerçekleştirilen grupların gösterimi.



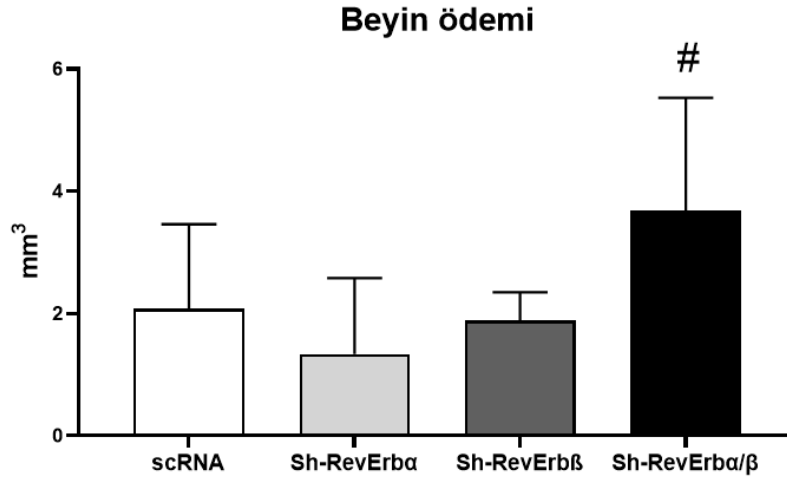
Şekil 6.2.4. TBH sonrası protein ifadesi baskılanan deney gruplarda (scRNA, Sh-RevErbα, Sh-RevErbβ, Sh-RevErbα + Sh-RevErbβ grupları) hasar hacminin analizi. Veri ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir. **p<0.01/ *p<0.05 scRNA grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Hasar hacimleri sırasıyla scRNA grubunda $23.62 \pm 9.17 \text{ mm}^3$, Sh-Rev-Erbα grubunda $26.63 \pm 11.72 \text{ mm}^3$, Sh-Rev-Erbβ grubunda $49.06 \pm 12.14 \text{ mm}^3$ ve Sh-Rev-Erbα + Sh-Rev-Erbβ grubunda $40.61 \pm 18.79 \text{ mm}^3$ olarak hesaplandı (Şekil 6.2.4.). Sh-Rev-Erbβ grubunun scRNA gruba göre istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede hasar hacmini arttığı görüldü. Sh-Rev-Erbα + Sh-Rev-Erbβ grubunun scRNA grubuna göre istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede hasar hacmini arttığı gözlemlendi. Sh-Rev-Erbα grubunun scRNA grubuna göre istatistik olarak anlamlı bir değişim görülmedi.



Şekil 6.2.5. TBH sonrası protein ifadesi baskılanan deney gruplarında (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) beyin ödemi analizi. Veri ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir.

Cresyl violet ile boyanan beyin kesitlerinden yapılan ödem analizinde sırasıyla Lv-GFP grubunda $4.0 \pm 1.7 \text{ mm}^3$, Lv-RevErb α grubunda $4.1 \pm 2.4 \text{ mm}^3$, Lv-RevErb β grubunda $2.5 \pm 0.8 \text{ mm}^3$ ve Lv-RevErb α + Lv-RevErb β grubunda $3.4 \pm 2.7 \text{ mm}^3$ olarak hesaplandı (Şekil 6.2.5.). Gruplar arasında yapılan analizler Lv-RevErb β grubunun diğer gruplara göre beyin ödemi en fazla düşüren grup olduğu tespit edildi. Ancak gruplar arasında yapılan istatistiksel analizlerde bu düşüşün istatistiksel olarak bir anlam taşımadığı gösterilmiştir.

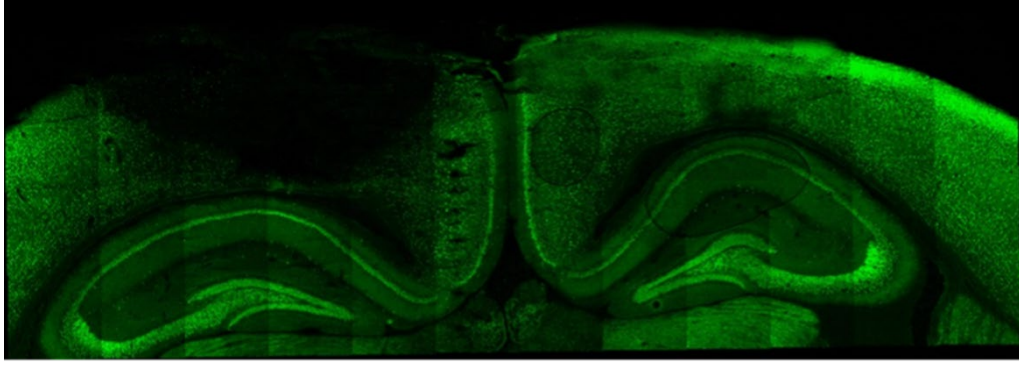


Şekil 6.2.6. TBH sonrası protein ifadesi baskılanan deney gruplarda (scRNA, Sh-RevErbα, Sh-RevErbβ, Sh-RevErbα + Sh-RevErbβ grupları) beyin ödemi analizi. Veri ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir. #p<0.05 Sh-RevErbα grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

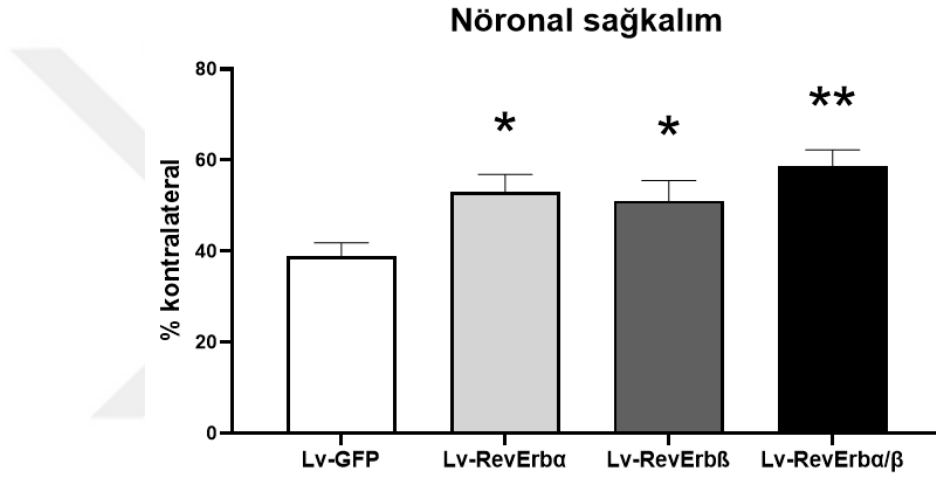
Cresyl violet ile boyanan beyin kesitlerinden yapılan ödem analizinde sırasıyla scRNA grubunda $1.8 \pm 1.7 \text{ mm}^3$, Sh-Rev-Erbα grubunda $1.3 \pm 1.2 \text{ mm}^3$, Sh-Rev-Erbβ grubunda $1.9 \pm 0.5 \text{ mm}^3$ ve Sh-Rev- Erbα + Sh-Rev-Erbβ grubunda $3.7 \pm 1.8 \text{ mm}^3$ olarak hesaplandı (Şekil 6.2.6.). Sh-Rev-Erbβ uygulanan deney grubunda diğer gruplara göre beyin ödeminin arttığı tespit edildi. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizlerde Sh-Rev-Erbβ'nın Sh-Rev- Erbα grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede beyin ödeminin artırdığı gözlemlendi.

6.3. Nöronal Sağkalım Analizi

Travmatik beyin hasarı operasyonlarından 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyinleri cryostat yardımı ile 2 mm aralıklarla 20 µm kalınlıkta kesildikten sonra NeuN antikoru kullanılarak immüno Floresan olarak boyanmıştır. (Şekil 6.3.1.) Boyama sonrası kesitler konfokal mikroskopta (LSM760, Zeiss) fotoğraflanmış, belirlenen alanlardaki hücreler sayılarak grupların ortalaması alınmıştır.

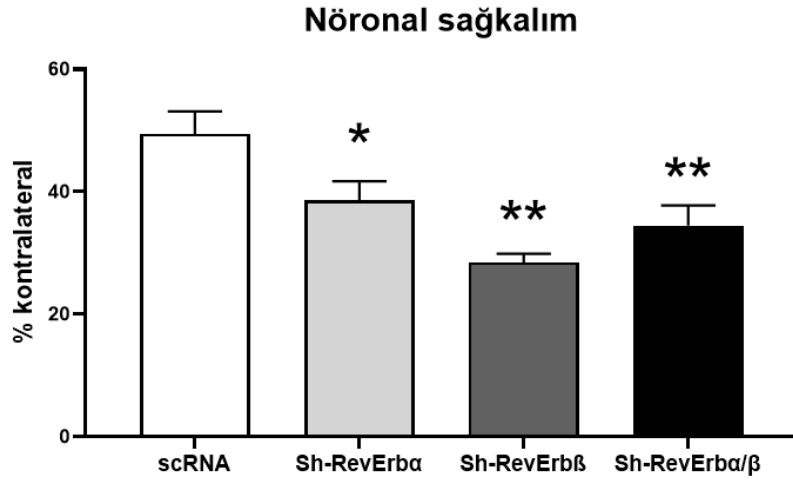


Şekil 6.3.1. TBH sonrasında nöronal çekirdek (NeuN) boyaması.



Şekil 6.3.2. Protein ifade artırımı yapılan gruplarda (Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α +Lv-RevErb β grupları) nöronal sağkalımın değerlendirilmesi. Veri ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

TBH sonrasında hayatta kalan nöron sayıları sırasıyla Lv-GFP grubunda 38.83 ± 7.9 , Lv-RevErb α grubunda 52.93 ± 10.27 , Lv-RevErb β grubunda 50.93 ± 12.02 ve Lv-RevErb α + Lv-RevErb β grubunda 58.60 ± 9.61 olarak hesaplandı (Şekil 6.3.2.). Lv-RevErb α grubunun Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede canlı nöron sayısının arttığı görüldü. Lv-RevErb β grubunun Lv-GFP grubuna istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede canlı nöron sayısının arttığı görüldü. Lv-RevErb α + Lv-RevErb β grubunun Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede canlı nöron sayısı artmıştır.

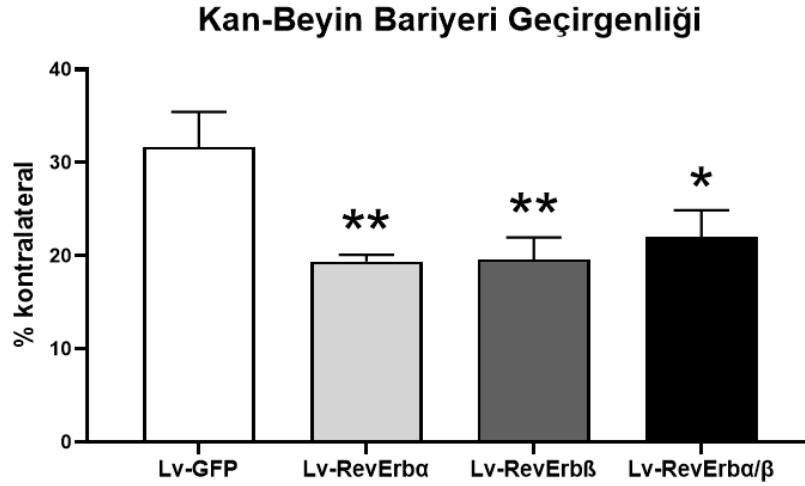


Şekil 6.3.3. Protein ifadesi baskılanan deney gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) nöronal sağkalımın değerlendirilmesi. Veri ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Hayatta kalan nöron sayıları sırasıyla scRNA grubu için 49.37 ± 9.84 , Sh-RevErb α grubu için 38.53 ± 8.48 , Sh-RevErb β grubu için 28.46 ± 3.74 ve Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grubu için $34.43 \pm 8,74$ olarak hesaplandı (Şekil 6.3.3.). Sh-RevErb α grubunun scRNA grubuna göre istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede canlı nöron sayısının azaldığı görüldü. Sh-RevErb β grubunun scRNA grubuna göre istatistiksel olarak ($p < 0.001$) anlamlı derecede yaşayan nöron sayısının azaldığı görüldü. Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grubunun scRNA grubuna göre istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede canlı nöron sayısı azalmıştır.

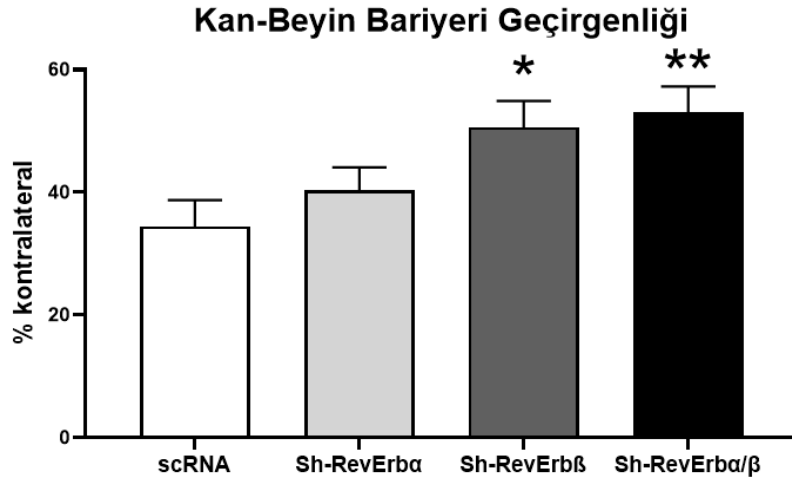
6.4. Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliği

Travmatik beyin hasarı operasyonlarından 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyinleri cryostat yardımı ile 2 mm aralıklarla 20 μ m kalınlıkta kesildikten sonra KBB geçirgenliğini değerlendirmek için IgG ekstravazasyon analiz metodu uygulanarak boyaması yapılmıştır. Boyama yapılan kesitlerden bilgisayar programı Image J ile analiz edildi ve bozulma oranı hesaplandı.



Şekil 6.4.1. Protein ifade artırımı yapılan deney gruplarında (Lv-GFP, Lv- RevErb α , Lv- RevErb β , Lv- RevErb α + Lv-RevErb β grupları) kan-beyin bariyeri geçirgenliği analizi. Veri ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ Lv-GFP grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

IgG metodu kullanılarak değerlendirilen KBB geçirgenliğinin kontralateral bölgeye göre bozulma yüzdeleri sırasıyla Lv-GFP grubu 31.65 ± 9.99 , Lv-RevErb α grubu için 19.38 ± 1.89 , Lv-RevErb β grubu için 19.58 ± 6.30 Lv-RevErb α + Lv-RevErb β grubu için $21.98 \pm 7,63$ olarak hesaplandı (Şekil 6.4.1.). Lv-RevErb α grubunun Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede KBB geçirgenliğinin daha az bozulduğu görüldü. Lv-RevErb β grubunun Lv-GFP grubuna istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede KBB geçirgenliği daha az bozulduğu görüldü. Lv-RevErb α + Lv-RevErb β grubunun Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede KBB geçirgenliği daha az bozulduğu gözlemlenmiştir.

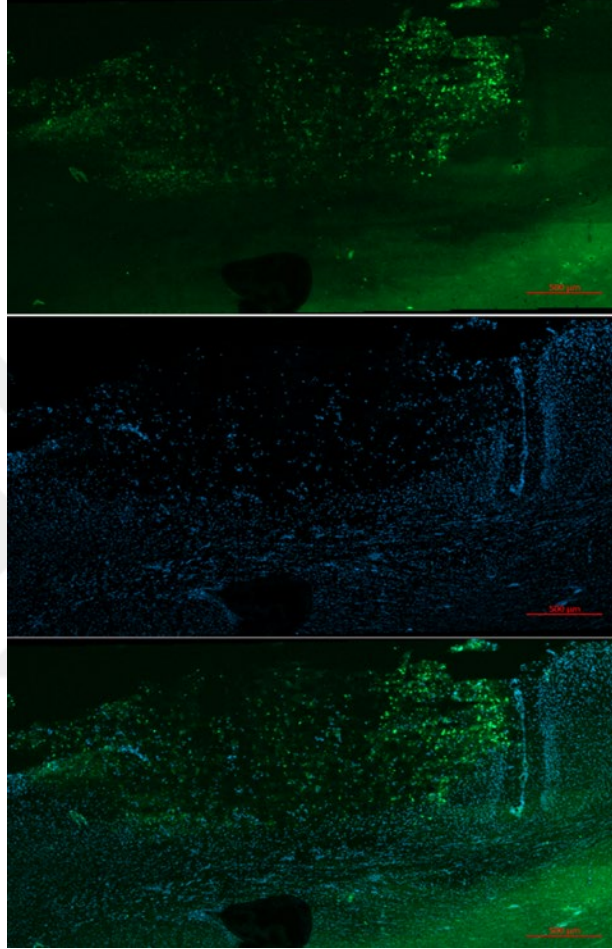


Şekil 6.4.2. Protein ifadesi baskılanmış deney gruplarında (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) kan-beyin bariyeri geçirgenliği analizi. Veri ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. **p<0.01/ *p<0.05 scRNA grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

IgG metodu kullanılarak değerlendirilen KBB geçirgenliğinin kontralateral bölgeye göre bozulma yüzdeleri sırasıyla scRNA grubu için 34.38 ± 11.51 , Sh-RevErb α grubu için 40.26 ± 9.98 , Sh-RevErb β grubu için 50.58 ± 11.47 ve Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grubu için $52.98 \pm 11,20$ olarak hesaplandı (Şekil 6.4.2.). Sh-Rev-Erb β grubunun scRNA gruba göre istatistiksel olarak (p<0.05) anlamlı derecede KBB bozulduğu görüldü. Sh-Rev-Erb α + Sh-Rev-Erb β grubunun scRNA grubuna göre istatistiksel olarak (p<0.01) anlamlı derecede KBB bozulduğu görüldü. Sh-Rev-Erb α grubunun scRNA grubuna göre istatistik olarak anlamlı bir değişim görülmedi.

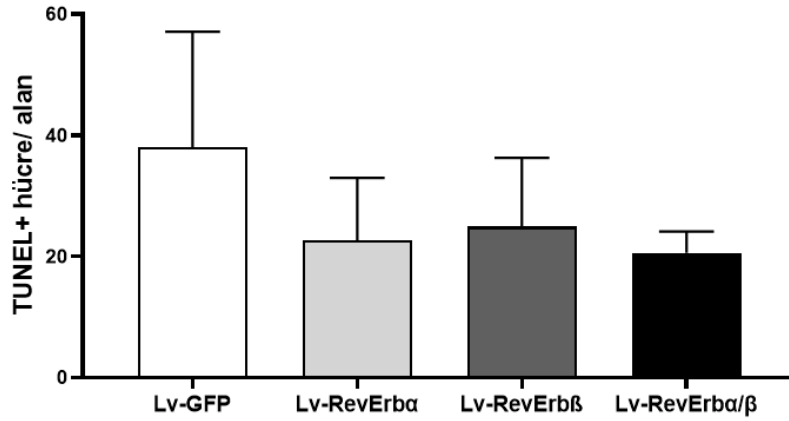
6.5. DNA Fragmantasyon Analizi

Travmatik beyin hasarına takiben 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerden alınan koronal beyin kesitlerine apoptotik hücrelerin tayini için TUNEL boyaması yapıldı (Şekil 6.5.1.).



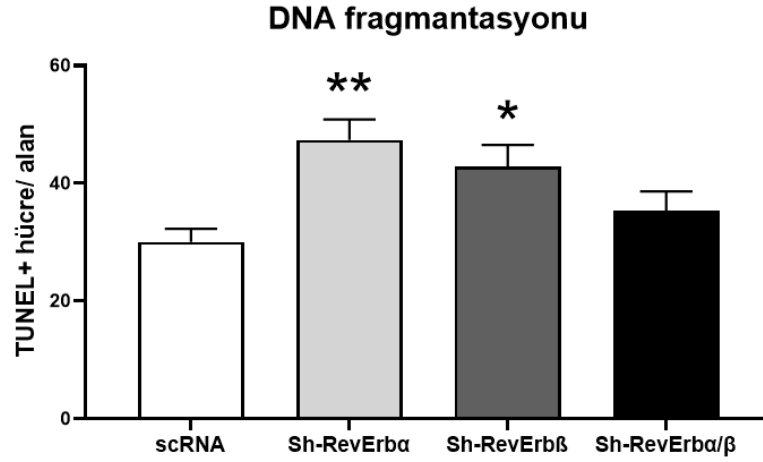
Şekil 6.5.1. TBH sonrası TUNEL boyaması.

DNA fragmantasyonu



Şekil 6.5.2. Protein ifade artırımı yapılan deney gruplarında (Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α + Lv-RevErb β grupları) TUNEL boyaması aracılığıyla DNA fragmantasyonunun belirlenmesi. Veri ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir.

Konfokal mikroskop vasıtasıyla görüntülenen beyin kesitleri Zen Blue (Carl Zeiss) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Hasarlı alandan belirlenen 9 farklı alandan ($62.500 \mu\text{m}^2$) TUNEL (+) hücre sayımı yapıldı. TBH sonrasında apoptotik hücre sayısı Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α + Lv-RevErb β gruplarının Lv-GFP grubuna göre apoptotik hücre sayısının daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.5.2.). Ancak gruplar arasında yapılan istatistiksel analizlerde bu farklılığın herhangi bir istatistiksel anlamlılık göstermediği gözlenmiştir.



Şekil 6.5.3. Protein ifadesi baskılanmış deney gruplarında (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) TUNEL boyaması aracılığıyla DNA fragmentasyonunun belirlenmesi. Veri ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. ** $p < 0.01$ / * $p < 0.05$ scRNA grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

TUNEL boyaması aracılığıyla ölçülen ortalama apoptotik hücre sayıları sırasıyla scRNA 30.00 ± 6.01 , Sh-RevErb α 47.33 ± 9.28 , Sh-RevErb β 42.78 ± 9.81 ve Sh-RevErb α + Sh-RevErb β 35.34 ± 8.67 olarak hesaplandı (Şekil 6.5.3.). Bu veriler sonucunda: Sh-RevErb α grubunun scRNA gruba göre istatistiksel olarak ($p < 0.01$) anlamlı derecede apoptotik hücre sayısının fazla olduğu görüldü. Sh-RevErb β grubunun scRNA grubuna göre istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı derecede apoptotik hücre sayısının fazla olduğu görüldü. Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grubunun scRNA grubuna göre istatistik olarak anlamlı bir değişim görülmedi.

6.6. Proteomik Analizler

Sirkadiyen ritmin önemli bir parçası olan RevErb proteinlerinin lentiviral vektörler kullanılarak ifadesinin artmasının veya baskılanmasının TBH sonrasında etkilediği protein profili yapmış olduğumuz proteomik analizlerle gösterilmiştir. Bu amaç için ultra performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) cihazı (ACQUITY UPLC M Class- SYNAPT G2-Si Mass Spectrometry, Waters, ABD) kullanılmıştır.

LC-MS/MS sonrasında elde edilen proteinler Lv-RevErb α , Lv-RevErb β ,Lv-RevErb α + Lv-RevErb β gruplar ile kontrol grubu olan Lv-GFP arasında RevErb proteininin ifadesinin atmasına bağlı olarak en az 1.4 kat değişen ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) ölçüde değişen 46 protein olduğu gösterilmiştir (Tablo 6.6.1-10).



Tablo 6.6.1 Proteomik analizlerle protein ifade artırımı yapılan gruplarda (Lv-GFP, Lv-RevErb α , LvRevErb β , Lv-RevErb α + Lv-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi.

UNIPROT	Protein ismi	GFP/ Rev-Erb α	GFP/ Rev-Erb β	GFP/ Rev-Erb α/β
P52760	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase	0,75	1,02	0,71
P62830	60S ribosomal protein L23	0,82	0,87	0,92
Q01065	Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1B	1,22	1,09	1,11
P24270	Catalase	1,33	1,52	1,32
O35927	Catenin delta-2	0,75	0,63	0,52
P40237	CD82 antigen	1,10	1,17	1,68
Q60952	Centrosome-associated protein CEP250	0,76	0,90	0,88
Q9WVK8	Cholesterol 24-hydroxylase	0,73	0,83	0,76
Q71M36	Chondroitin sulfate proteoglycan 5	0,89	0,66	0,77
Q640L5	Coiled-coil domain-containing protein 18	0,77	0,83	0,86
Q7TQK5	Coiled-coil domain-containing protein 93	0,57	1,20	1,15
Q14AX6	Cyclin-dependent kinase 12	0,85	0,84	0,86
B1AQF4	Dual specificity protein phosphatase	1,08	0,71	0,76
O70585	Dystrobrevin beta	0,89	0,63	0,85
P23116	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	0,77	0,76	0,76
Q9Z0E6	Guanylate-binding protein 2	0,52	0,35	0,47
Q05A75	H-2 class I histocompatibility antigen, TLA(B) alpha chain	1,21	1,41	1,17
P01942	Hemoglobin subunit alpha	1,06	0,95	2,52
Q60766	Immunity-related GTPase family M protein 1	0,87	0,60	0,90
A0A075B6A3	Immunoglobulin heavy constant alpha (Fragment)	0,32	0,18	0,19
P01837	Immunoglobulin kappa constant	0,54	0,53	0,43
A0A140T8N9	Immunoglobulin kappa variable 6-32 (Fragment)	0,75	0,48	0,32
Q9DCE9	Interferon gamma-induced GTPase	0,89	0,68	0,94
Q9QZ85	Interferon-inducible GTPase 1	0,67	0,53	0,90
O54983	Ketimine reductase mu-crystallin	0,66	0,76	0,72
Q62234	Myomesin-1	1,09	1,17	1,44
P03921	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	1,60	1,93	1,39
P13595	Neural cell adhesion molecule 1	0,72	0,91	0,86
Q99KQ4	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	0,76	0,63	0,80
Q99K48	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	1,29	1,41	1,22
P48725	Pericentrin	2,05	1,05	0,98
P15331	Peripherin	1,11	1,41	0,98
Q2M3X8	Phosphatase and actin regulator 1	0,64	0,62	0,53
Q8R574	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	0,52	0,89	0,64
Q9CY58	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	0,82	0,75	0,84
Q60829	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B	2,04	1,68	1,33
P42208	Septin-2	0,82	0,78	0,80
Q3UU96	Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha	0,79	0,68	0,83
Q60676	Serine/threonine-protein phosphatase 5	1,26	1,47	1,26
P55194	SH3 domain-binding protein 1	0,79	0,81	0,81
Q99K94	Signal transducer and activator of transcription	0,86	0,69	0,86
Q91Z67	SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 2	1,22	1,57	1,31
Q8CG46	Structural maintenance of chromosomes protein 5	1,61	1,40	1,55
E9Q2T3	Tenascin XB	0,73	0,66	0,89
Q9JJ11	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3	1,17	1,27	0,92
Q640M1	U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A	1,09	0,98	1,21

Tablo 6.6.2. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi-1.

UNIPROT	Protein ismi	Sh-Rev-Erb α	Sh-Rev-Erb β	Sh-Rev-Erb α/β
O08810	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	1,30	1,50	1,57
O70456	14-3-3 protein sigma	0,72	0,61	0,61
P68254	14-3-3 protein theta	1,34	1,62	1,61
Q8VDM4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	0,68	0,59	0,56
P14685	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	1,36	2,65	2,77
P62334	26S proteasome regulatory subunit 10B	1,86	1,89	2,21
O88685	26S proteasome regulatory subunit 6A	1,31	1,72	1,69
Q60597	2-oxoglutarate dehydrogenase	0,75	0,72	0,65
P24815	3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta 5-->4-isomerase type 1	1,15	3,11	3,06
Q8BWT1	3-ketoacyl-CoA thiolase	1,89	1,73	1,89
P62264	40S ribosomal protein S14	0,54	0,50	0,48
P25444	40S ribosomal protein S2	0,68	0,62	0,60
P97351	40S ribosomal protein S3a	1,75	1,26	1,83
P62242	40S ribosomal protein S8	0,63	0,48	0,52
P97789	5'-3' exoribonuclease 1	1,57	2,21	1,94
Q3UHB1	5'-nucleotidase domain-containing protein 3	1,43	1,36	1,28
P47955	60S acidic ribosomal protein P1	0,62	0,64	0,65
P47963	60S ribosomal protein L13	0,70	0,54	0,57
Q9CR57	60S ribosomal protein L14	0,68	0,67	0,65
Q6ZVW7	60S ribosomal protein L35	0,70	0,61	0,56
P47911	60S ribosomal protein L6	0,67	0,66	0,63
P14148	60S ribosomal protein L7	0,66	0,60	0,58
P62918	60S ribosomal protein L8	0,61	0,48	0,50
Q8CBW3	Abl interactor 1	1,32	1,39	1,62
Q8K4G5	Actin-binding LIM protein 1	1,93	2,45	2,18
Q9R0Q6	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A	0,48	0,37	0,38
P59999	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	0,51	0,40	0,44
Q9D898	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	0,58	0,37	0,36
Q9D0S9	Adenine 5'-monophosphoramidase HINT2	1,41	1,73	1,62
P50247	Adenylylhomocysteinase	1,41	1,78	1,82
P84078	ADP-ribosylation factor 1	1,52	2,13	1,95
E9Q394	A-kinase anchor protein 13	0,56	0,32	0,43
Q8BGQ7	Alanine--tRNA ligase	0,65	0,48	0,60
P07724	Albumin	0,50	0,36	0,32
P57780	Alpha-actinin-4	0,43	0,30	0,34
Q9QYC0	Alpha-adducin	0,37	0,24	0,33
P61164	Alpha-centractin	0,45	0,42	0,51
O55042	Alpha-synuclein	0,68	0,62	0,60
A0A286YCS4	Anion exchange protein	0,99	1,23	1,53
Q8BIZ1	Ankyrin repeat and sterile alpha motif domain-containing protein 1B	0,64	0,55	0,53
Q99NH0	Ankyrin repeat domain-containing protein 17	0,72	0,65	0,68
S4R1M4	Ankyrin-2 (Fragment)	1,94	3,08	2,75
S4R2Q9	Ankyrin-2 (Fragment)	0,59	0,58	0,74
O35643	AP-1 complex subunit beta-1	1,54	1,89	2,09
P08226	Apolipoprotein E	0,71	0,64	0,76
Q8K2H4	Arf-GAP with coiled-coil	2,18	1,54	2,29
Q3UHD9	Arf-GAP with GTPase	0,47	0,41	0,39
B2RW07	Ataxin 7-like 1	0,33	0,23	0,21
Q03265	ATP synthase subunit alpha	0,69	0,63	0,62

Tablo 6.6.3. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi-2.

UNIPROT	Protein ismi	Sh-Rev-Erb α	Sh-Rev-Erb β	Sh-Rev-Erb α/β
P56480	ATP synthase subunit beta	0,68	0,63	0,66
Q9DCX2	ATP synthase subunit d	0,69	0,56	0,61
Q91VR2	ATP synthase subunit gamma	0,69	0,57	0,62
Q91V92	ATP-citrate synthase	1,55	1,92	2,37
Q62095	ATP-dependent RNA helicase DDX3Y	0,60	0,47	0,51
Q3UHR0	BAH and coiled-coil domain-containing protein 1	0,36	0,43	0,57
P18572	Basigin	1,22	1,28	1,72
Q8CGN4	BCL-6 corepressor	0,60	0,56	0,58
Q9QYB8	Beta-adducin	0,64	0,46	0,53
Q8R5C5	Beta-centractin	2,12	3,44	3,33
P21550	Beta-enolase	0,68	0,62	0,69
Q91ZZ3	Beta-synuclein	0,74	1,00	0,70
Q80YN3	Breast carcinoma-amplified sequence 1 homolog	0,69	0,62	0,71
Q6WVG3	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	0,86	0,61	0,61
P11798	Calcium/calm ulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	0,83	0,50	0,53
Q80TJ1	Calcium-dependent secretion activator 1	0,37	0,25	0,23
P0DP26	Calm ulin-1	1,64	1,90	1,88
A2A891	Calm ulin-binding transcription activator 1	2,53	1,61	2,43
Q8CCS7	Calretinin	1,52	2,04	1,82
Q9DBC7	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	2,26	2,97	3,28
E9Q3M9	Capping protein-inhibiting regulator of actin-like	0,43	0,26	0,34
P48758	Carbonyl reductase [NADPH] 1	1,82	2,43	2,00
E9PYP1	Carboxylic ester hydrolase	0,61	0,36	0,56
Q6P9K8	Caskin-1	0,73	0,50	0,57
O35927	Catenin delta-2	0,72	0,69	0,62
Q5M8N0	CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1	1,50	1,99	2,07
Q61490	CD166 antigen	1,83	1,92	1,92
Q91WS0	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	2,32	3,20	3,19
Q8R464	Cell adhesion molecule 4	0,49	0,28	0,28
E9Q3P4	Centromere protein F	0,23	0,18	0,16
Q8BQ48	Centr omal protein of 295 kDa	0,65	0,45	0,57
Q9D3R3	Centr omal protein of 72 kDa	1,20	2,48	1,83
Q9D8B3	Charged multivesicular b y protein 4b	0,54	0,40	0,36
A0A140LIX9	Cilia and flagella-associated protein 99	0,72	0,38	0,50
F6XLV1	Ciliary rootlet coiled-coil protein 2	0,63	0,48	0,60
Q6AW69	Cingulin-like protein 1	0,29	0,12	0,13
Q9CZU6	Citrate synthase	0,53	0,35	0,42
Q8CDI7	Coiled-coil domain-containing protein 150	0,91	0,57	0,79
Q8CDI6	Coiled-coil domain-containing protein 158	0,90	1,77	1,87
Q8CDV0	Coiled-coil domain-containing protein 178	0,61	0,53	0,52
Q01149	Collagen alpha-2(I) chain	1,40	1,82	1,78
Q3U962	Collagen alpha-2(V) chain	1,53	2,49	2,45
Q3U422	Complex I-9kD	0,45	0,31	0,39
Q80YA9	Connector enhancer of kinase suppressor of ras 2	0,71	0,64	0,60
Q9CZ04	COP9 signal ome complex subunit 7a	1,38	1,97	1,65
Q9Z140	Copine-6	0,63	0,43	0,41
Q3UMF0	Cordon-bleu protein-like 1	0,67	0,58	0,66
Q6ZQ38	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	1,54	1,38	1,60
Q9DB77	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	0,67	0,60	0,63
Q9D855	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	0,66	0,71	0,63

Tablo 6.6.4. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi-3.

UNIPROT	Protein ismi	Sh-Rev-Erb α	Sh-Rev-Erb β	Sh-Rev-Erb α/β
P00405	Cytochrome c oxidase subunit 2	1,48	1,75	1,94
P19536	Cytochrome c oxidase subunit 5B	0,49	0,29	0,37
Q9DCW5	Cytochrome c oxidase subunit	0,59	0,41	0,50
F6ZX84	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 (Fragment)	1,89	2,30	2,32
O88485	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 1	0,39	0,28	0,29
Q8R1Q8	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	1,34	1,60	1,73
Q9CPY7	Cyt of aminopeptidase	0,49	0,44	0,43
Q8CDD3	Delta-tubulin	1,04	0,66	1,20
Q9WV69	Dematin	0,64	0,46	0,51
Q3U1T9	DENN domain-containing protein 1B	1,56	1,65	1,67
Q9D2G2	2-oxoglutarate dehydrogenase complex component E2	0,75	0,56	0,66
Q8BV14	Dihydropteridine reductase	0,75	0,56	0,62
O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	0,64	0,54	0,54
B1AZP2	Disks large-associated protein 4	0,30	0,19	0,25
Q8BPN8	DmX-like protein 2	0,72	0,54	0,62
Q9DBG6	Dolichyl-diphoolig accharide--protein glycoltransferase subunit 2	1,97	1,99	2,33
Q62418	Drebrin-like protein	0,47	0,27	0,36
P47809	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4	0,69	0,60	0,62
A0A0J9YUE9	Dynamamin GTPase	0,64	0,49	0,52
Q8K1M6	Dynamamin-1-like protein	0,50	0,63	0,48
P58281	Dynamamin-like 120 kDa protein	0,60	0,54	0,57
P62627	Dynein light chain roadblock-type 1	0,49	0,40	0,44
Q80TP3	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	0,85	0,62	0,66
Q8BL66	Early endosome antigen 1	0,41	0,20	0,33
Q9D8Y0	EF-hand domain-containing protein D2	0,60	0,50	0,52
Q9DCW4	Electron transfer flavoprotein subunit beta	0,67	0,64	0,57
Q99M11	ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1	0,40	0,21	0,31
P10126	Elongation factor 1-alpha 1	0,69	0,51	0,58
P62631	Elongation factor 1-alpha 2	0,72	0,59	0,65
P20029	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	0,62	0,54	0,52
Q8BH95	Enoyl-CoA hydratase	1,54	1,45	1,63
Q3US41	Epithelial splicing regulatory protein 1	1,00	0,92	0,71
Q5NCM5	Epsin-2	1,52	1,45	1,46
Q5EBJ4	Ermin	0,68	0,64	0,62
P60843	Eukaryotic initiation factor 4A-I	0,53	0,42	0,47
P10630	Eukaryotic initiation factor 4A-II	0,59	0,54	0,53
Q6NZJ6	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	0,59	0,30	0,40
Q8BGD9	Eukaryotic translation initiation factor 4B	0,52	0,34	0,43
Q9WUK2	Eukaryotic translation initiation factor 4H	0,38	0,25	0,28
P56564	Excitatory amino acid transporter 1	1,26	1,67	1,59
P26040	Ezrin	0,54	0,49	0,55
P47757	F-actin-capping protein subunit beta	0,62	0,45	0,49
E9PW83	Family with sequence similarity 184	0,79	0,63	0,62
Q91WJ8	Far upstream element-binding protein 1	0,91	1,39	1,11
P29391	Ferritin light chain 1	0,60	0,63	0,53
E9PV24	Fibrinogen alpha chain	0,54	0,40	0,33
O08917	Flotillin-1	0,49	0,33	0,34
Q60634	Flotillin-2	1,31	1,66	1,58
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	0,64	0,57	0,57
Q91Y97	Fructose-bisphosphate aldolase B	1,24	2,38	1,81

Tablo 6.6.5. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi-4.

UNIPROT Protein ismi	Sh-Rev-Erb α	Sh-Rev-Erb β	Sh-Rev-Erb α/β
Q3UNH4	0,60	0,52	0,63
Q8VE33	2,24	3,14	2,86
P13020	0,68	0,50	0,66
Q8BUV3	1,35	1,29	1,37
P03995	0,60	0,67	0,67
P06745	1,56	1,91	1,98
O08795	0,70	0,57	0,59
Q9Z2W9	1,61	2,43	2,36
Q9D172	0,64	0,56	0,52
P15105	0,63	0,35	0,45
P51855	1,44	1,28	1,47
P16858	0,74	0,60	0,72
Q9ET01	0,50	0,32	0,45
E9PVZ8	0,28	0,23	0,23
Q91VV5	0,70	0,60	0,62
P08556	0,51	0,40	0,45
P63094	0,68	0,55	0,55
P27601	1,59	1,45	1,83
P17879	0,70	0,60	0,61
P16627	0,67	0,61	0,60
P48722	0,64	0,63	0,63
Q61699	0,65	0,54	0,53
P17156	0,66	0,52	0,55
P01942	0,55	0,31	0,49
Q9CX86	0,53	0,45	0,51
P49312	0,57	0,48	0,54
Q9D0E1	0,65	0,60	0,54
Q8VEK3	0,65	0,54	0,59
O88569	0,60	0,47	0,52
Q8BRB7	1,36	1,74	1,67
P43274	0,62	0,60	0,53
Q8BFU2	0,67	0,74	0,69
Q8CGP1	0,66	0,72	0,69
P84244	0,71	0,79	0,81
A2A934	0,90	0,79	0,86
Q9Z2Y3	0,67	0,72	0,65
Q99L47	1,30	1,67	1,39
P00493	1,21	1,63	1,53
Q60766	0,40	0,54	0,49
Q8R366	0,71	0,59	0,60
P70168	0,60	0,37	0,56
Q63ZW7	1,78	2,25	1,61
P11881	1,80	1,63	2,03
O55023	0,60	0,45	0,51
P15208	0,21	0,07	0,12
A6X935	1,25	2,13	3,00
Q9DCE9	0,20	0,35	0,25
Q6VH22	0,70	0,56	0,56
Q3TES0	0,74	0,69	0,67
Q8C0M9	1,38	1,59	1,59

Tablo 6.6.6. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi-5.

UNIPROT	Protein ismi	Sh-Rev-Erb α	Sh-Rev-Erb β	Sh-Rev-Erb α/β
A2CG49	Kalirin	0,66	0,64	0,75
Q80TG1	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	0,36	0,11	0,20
P28738	Kinesin heavy chain isoform 5C	0,71	0,55	0,60
Q9QXL2	Kinesin-like protein KIF21A	0,62	0,49	0,49
P28740	Kinesin-like protein KIF2A	0,76	0,98	0,75
P21619	Lamin-B2	0,61	0,60	0,60
Q9JJK2	LanC-like protein 2	1,73	1,88	2,02
Q91YU6	Leucine zipper putative tumor suppressor 2	0,77	0,66	0,65
Q9D1T0	Leucine-rich repeat neuronal protein 1	0,71	0,62	0,68
Q80TE7	Leucine-rich repeat-containing protein 7	1,60	1,95	1,82
Q61735	Leukocyte surface antigen CD47	1,94	3,05	3,07
Q61792	LIM and SH3 domain protein 1	0,78	0,63	0,72
Q9DC07	LIM zinc-binding domain-containing Nebulette	0,53	0,39	0,39
P60469	Liprin-alpha-3	0,56	0,40	0,36
P06151	L-lactate dehydrogenase A chain	0,66	0,53	0,56
P00342	L-lactate dehydrogenase C chain	0,62	0,50	0,52
Q91WC3	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 6	0,62	0,46	0,52
A2A813	Maillard deglycase	1,61	1,83	1,86
Q924M7	Mann e-6-ph phate isomerase	0,49	0,64	0,32
Q9WVQ1	Membrane-associated guanylate kinase	1,15	1,88	1,79
Q9JLZ3	Methylglutaconyl-CoA hydratase	1,49	2,14	1,76
Q9EQ20	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating]	0,57	0,24	0,39
P16332	Methylmalonyl-CoA mutase	1,45	1,82	1,76
Q9QYR6	Microtubule-associated protein 1A	0,63	0,46	0,40
P20357	Microtubule-associated protein 2	0,62	0,55	0,54
P27546	Microtubule-associated protein 4	0,54	0,44	0,46
Q8R001	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	0,34	0,23	0,27
Q6PER3	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	1,20	1,14	1,27
P10637	Microtubule-associated protein tau	0,58	0,50	0,51
Q91VR7	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A	1,57	2,32	2,12
Q9JM52	Misshapen-like kinase 1	0,71	0,63	0,65
Q8K009	Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	0,49	0,36	0,38
Q9D6M3	Mitochondrial glutamate carrier 1	1,59	1,51	1,53
Q9CZW5	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	0,73	0,61	0,59
Q63844	Mitogen-activated protein kinase 3	0,60	0,44	0,52
A0A1Y7VMP7	MutL homolog 3	0,86	0,59	0,68
A0A498WGS3	Myelin basic protein	0,49	0,31	0,39
Q9D2P8	Myelin-associated olig endrocyte basic protein	2,54	2,67	2,63
O70624	Myocilin	1,21	1,87	1,87
Q80YT7	Myomegalin	0,52	0,45	0,42
A2ABU4	Myomesin-3	0,37	0,28	0,25
Q60605	My in light polypeptide 6	0,66	0,56	0,61
Q5SX40	My in-1	1,53	1,36	1,83
Q61879	My in-10	0,55	0,41	0,46
Q6URW6	My in-14	0,58	0,49	0,52
P13541	My in-3	1,82	2,20	2,48
Q8VDD5	My in-9	0,61	0,40	0,45
G3X9J1	Na(+)/Ca(2+)-exchange protein 1	0,61	0,60	0,74
P70441	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	0,57	0,46	0,47
Q7TMF3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	1,57	2,12	2,08

Tablo 6.6.7. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi-6.

UNIPROT	Protein ismi	Sh-Rev-Erb α	Sh-Rev-Erb β	Sh-Rev-Erb α/β
Q9DCJ5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	0,59	0,50	0,54
Q9DC69	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9	0,48	0,41	0,42
Q9CQH3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5	1,60	2,05	1,89
Q9CQ54	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	0,63	0,51	0,56
Q9DCT2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3	0,55	0,41	0,54
P06801	NADP-dependent malic enzyme	0,31	0,17	0,24
P70670	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	0,53	0,39	0,49
P13595	Neural cell adhesion molecule 1	1,27	1,68	1,42
Q6P9K9	Neurexin-3	1,39	2,33	1,84
P55066	Neurocan core protein	0,45	0,19	0,24
Q810U3	Neurofascin	0,66	0,82	0,63
E9Q842	Neuron navigator 2	1,40	1,73	1,52
Q810U4	Neuronal cell adhesion molecule	0,76	0,48	0,51
P35803	Neuronal membrane glycoprotein M6-b	0,69	0,56	0,54
Q0VGU4	Neur ectretory protein VGF	0,68	0,56	0,59
Q61043	Ninein	1,00	0,61	0,81
Q9CZ44	NSFL1 cofactor p47	0,66	0,56	0,57
Q9JIH2	Nuclear pore complex protein Nup50	0,59	0,49	0,43
Q91W39	Nuclear receptor coactivator 5	0,26	0,10	0,15
Q02819	Nucleobindin-1	0,44	0,27	0,36
P09405	Nucleolin	0,69	0,63	0,62
Q9Z0P4	Paralemmin-1	0,33	0,36	0,37
Q9D0J8	Parathym in	0,88	0,89	0,72
A0A1W2P737	Pericentrin	0,43	0,43	0,35
Q61171	Peroxiredoxin-2	0,63	0,52	0,52
O08709	Peroxiredoxin-6	0,96	1,01	1,22
Q2PFD7	PH and SEC7 domain-containing protein 3	0,38	0,24	0,29
Q80TL4	PHD finger protein 24	0,60	0,44	0,48
Q9D0F9	Ph phoglucomutase-1	0,70	0,65	0,70
P09041	Ph phoglycerate kinase 2	0,38	0,28	0,37
Q7TME0	Ph pholipid ph phatase-related protein type 4	0,76	0,56	0,61
Q8K0S0	Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting protein	1,41	1,21	1,28
Q9CY58	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	0,54	0,40	0,47
Q61233	Plastin-2	0,55	0,53	0,56
A0A0R4J218	Plectin (Fragment)	0,58	0,37	0,41
P60335	Poly(rC)-binding protein 1	0,66	0,57	0,55
Q91Z31	Polypyrimidine tract-binding protein 2	1,95	2,17	2,34
P0CG49	Polyubiquitin-B	0,53	0,39	0,44
O88703	Brain cyclic nucleotide-gated channel 2	0,71	0,64	0,72
Q64436	Potassium-transporting ATPase alpha chain 1	1,38	1,55	1,78
Q61838	Pregnancy zone protein	1,51	2,00	1,70
P48678	Prelamin-A/C	0,71	0,66	0,64
Q501J6	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	0,51	0,43	0,39
S4R2P5	Probable RNA-binding protein 46	0,58	0,80	0,69
Q5SX49	Profilin	1,51	2,13	2,00
Q9JJV2	Profilin-2	0,75	0,59	0,63
P67778	Prohibitin 1	0,46	0,33	0,43
E9PUL5	Proline-rich transmembrane protein 2	1,55	2,13	1,51
Q9QXT0	Protein canopy homolog 2	0,69	0,68	0,59
Q4VAA2	Protein CDV3	0,61	0,32	0,46

Tablo 6.6.8. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi-7.

UNIPROT	Protein ismi	Sh-Rev-Erb α	Sh-Rev-Erb β	Sh-Rev-Erb α/β
P27773	Protein disulfide-isomerase A3	0,68	0,67	0,68
Q922R8	Protein disulfide-isomerase A6	0,52	0,41	0,42
P09103	Protein disulfide-isomerase	1,06	2,22	1,74
Q8CJF7	Protein ELYS	0,65	0,37	0,47
Q8BUK6	Protein Hook homolog 3	0,81	0,54	0,70
P63318	Protein kinase C gamma type	0,66	0,43	0,53
Q2EMV9	Protein mono-ADP-rib yltransferase PARP14	0,67	0,54	0,55
Q8BTG7	Protein NDRG4	1,31	1,68	1,74
O55125	Protein NipSnap homolog 1	1,56	2,09	2,07
Q9D394	Protein RUFY3	0,64	0,50	0,45
Q5DTT3	Protein TASOR 2	1,54	1,59	2,00
Q8BZ32	Putative Polycomb group protein ASXL2	0,71	0,61	0,63
Q91XF0	Pyridoxine-5'-ph phate oxidase	0,71	0,64	0,69
Q05920	Pyruvate carboxylase	0,67	0,55	0,57
P52480	Pyruvate kinase PKM	0,66	0,48	0,53
P50396	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	1,35	1,28	1,47
P26043	Radixin	0,55	0,50	0,48
P34022	Ran-specific GTPase-activating protein	1,24	1,53	1,21
Q8CHG7	Rap guanine nucleotide exchange factor 2	0,70	0,62	0,74
P62821	Ras-related protein Rab-1A	1,22	1,66	1,66
Q8BHC1	Ras-related protein Rab-39B	1,46	2,48	1,90
P62823	Ras-related protein Rab-3C	0,71	0,65	0,56
Q8CB87	Ras-related protein Rab-44	1,21	0,57	0,93
P63321	Ras-related protein Ral-A	1,46	1,46	1,42
P68040	Receptor of activated protein C kinase 1	1,52	1,93	1,65
Q64487	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta	0,70	0,55	0,61
B9EKR1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	0,60	0,51	0,52
Q99NE5	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1	1,57	1,83	2,06
O54829	Regulator of G-protein signaling 7	1,01	1,60	0,92
Q99P72	Reticulon-4	0,60	0,41	0,46
Q8BL80	Rho GTPase-activating protein 22	0,88	0,59	0,76
O54834	Rho GTPase-activating protein 6	0,63	0,38	0,46
E9Q0A3	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11 (Fragment)	0,95	0,87	0,77
Q60875	Rho guanine nucleotide exchange factor 2	0,70	0,44	0,46
A0A1Y7VMN0	Rho-associated protein kinase 2 (Fragment)	0,84	0,54	0,65
Q9CPN9	RIKEN cDNA 2210010C04 gene	0,49	0,39	0,34
A0A0G2JGW5	RIMS-binding protein 2	0,55	0,25	0,35
B2RXS3	S phase cyclin A-associated protein in the ER	0,37	0,29	0,33
Q8R429	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	0,71	0,62	0,60
Q9R1T4	Septin-6	0,67	0,58	0,62
Q80UG5	Septin-9	0,73	0,54	0,68
P07759	Serine protease inhibitor A3K	0,39	0,24	0,25
Q8BT18	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	0,42	0,29	0,27
Q80UW5	Serine/threonine-protein kinase MRCK gamma	0,58	0,40	0,40
Q8CIN4	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	0,78	0,56	0,63
Q8BYC6	Serine/threonine-protein kinase TAO3	0,46	0,23	0,33
P58389	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	1,26	1,32	1,62
E0CZ78	Serine/threonine-protein phosphatase	0,67	0,45	0,54
P62137	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	1,13	1,71	1,61
H3BJP2	S-formylglutathione hydrolase (Fragment)	1,59	1,98	2,17

Tablo 6.6.9. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi-8.

UNIPROT	Protein ismi	Sh-Rev-Erb α	Sh-Rev-Erb β	Sh-Rev-Erb α/β
D3YZU1	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1	0,62	0,57	0,54
D3Z5K8	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2	0,59	0,41	0,47
Q4ACU6	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3	0,37	0,20	0,28
P31650	Sium- and chloride-dependent GABA transporter 3	1,17	2,00	2,00
Q8K596	Sium/calcium exchanger 2	0,73	0,52	0,63
Q6PIE5	Sium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	0,63	0,51	0,58
Q6PIC6	Sium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	0,61	0,52	0,57
P55012	Solute carrier family 12 member 2	1,20	1,86	1,53
Q91V14	Solute carrier family 12 member 5	0,59	0,60	0,67
Q9D3S3	Sorting nexin-29	1,56	2,81	3,26
P70663	SPARC-like protein 1	0,76	0,60	0,59
Q68FG2	Spectrin beta chain	0,64	0,52	0,47
E9PX29	Spectrin beta chain	0,48	0,41	0,45
Q62261	Spectrin beta chain	0,65	0,56	0,57
Q7TME2	Sperm-associated antigen 5	0,76	0,46	0,57
Q80VP2	Spermatogenesis-associated protein 7 homolog	0,34	0,21	0,18
Q9WTX5	S-phase kinase-associated protein 1	1,89	3,47	2,58
Q8VIJ6	Splicing factor	0,63	0,64	0,57
Q60598	Src substrate cortactin	0,55	0,40	0,42
F6XZJ7	Sterile alpha motif domain-containing protein 15	2,36	2,04	2,25
P38647	Stress-70 protein	0,65	0,55	0,56
Q61466	SWI/SNF complex 60 kDa subunit	0,58	0,43	0,43
O88935	Synapsin-1	0,67	0,54	0,56
Q62277	Synaptophysin	1,76	2,75	2,47
P60879	Synaptosomal-associated protein 25	0,54	0,43	0,43
P46096	Synaptotagmin-1	0,70	0,58	0,58
P61264	Syntaxin-1B	0,67	0,59	0,56
O70439	Syntaxin-7	1,21	1,83	1,35
Q8K400	Syntaxin-binding protein 5	1,18	2,18	2,01
P26039	Talin-1	0,52	0,33	0,44
P80314	T-complex protein 1 subunit beta	1,32	1,49	1,57
P80316	T-complex protein 1 subunit epsilon	1,23	1,56	1,51
Q6PR54	Telomere-associated protein RIF1	1,36	1,08	2,08
Q9JMH6	Thioredoxin reductase 1	1,90	2,90	2,67
Q8CCT4	Transcription elongation factor A protein-like 5	0,46	0,29	0,38
P40142	Transketolase	0,57	0,37	0,48
A0A0R4J2D3	Transport and Golgi organization protein 1 homolog	1,62	1,35	1,30
Q8BQ33	Treslin	0,66	0,52	0,53
D3Z618	Tropomyosin alpha-3 chain	0,61	0,46	0,41
P97797	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1	0,51	0,28	0,40
Q9QZM0	Ubiquilin-2	0,53	0,46	0,44
P31254	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 Y	0,58	0,56	0,48
Q99PL6	UBX domain-containing protein 6	0,66	0,61	0,68
Q62059	Versican core protein	0,53	0,39	0,41
D3YTU0	Vesicle-associated membrane protein 1	0,69	0,49	0,58
P20152	Vimentin	0,30	0,33	0,31
Q64727	Vinculin	1,67	1,62	2,20
Q60930	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	0,69	0,81	0,71
P57746	V-type proton ATPase subunit D	0,64	0,67	0,57
Q8CBE3	WD repeat-containing protein 37	1,71	3,27	2,90

Tablo 6.6.10. Proteomik analizlerle protein ifadesi baskılanmış gruplarda (scRNA, Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α + Sh-RevErb β grupları) değişen protein profilinin belirlenmesi-9.

UNIPROT Protein ismi	Sh-Rev-Erb α	Sh-Rev-Erb β	Sh-Rev-Erb α/β
Q8R5H6 Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1	0,48	0,39	0,34
Q3UE92 Xaa-Pro aminopeptidase 1	1,04	1,68	1,33
Q8BJH1 Zinc finger C2HC domain-containing protein 1A	0,65	0,59	0,65

LC-MS/MS sonrasında elde edilen proteinler Sh-RevErb α , Sh-RevErb β , Sh-RevErb α +Sh-RevErb β gruplar ile kontrol grubu olan scRNA arasında RevErb proteinin ifadesinin baskılanmasına bağlı olarak en az 1.4 kat değişen ve istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) ölçüde değişen 402 protein olduğu gösterilmiştir. Elde edilen veriler ısı haritası şeklinde gösterilmiştir (Tablo 6.6.1-10).

Protein ifadesi artırılmış deney gruplarından elde edilen proteinler PANTHER (protein analysis through evolutionary relationship; <http://www.pantherdb.org/>) programı aracılığıyla analiz edildiğinde aşağıda belirtilen sinyal iletim yollarının bu proteinler aracılığıyla etkilendiği tespit edilmiştir.

- Cadherin sinyal iletimi
- Dopamin reseptörü aracılı sinyal iletimi
- Nikotin farmakodinamiği sinyal iletimi
- PDGF sinyal iletimi
- Parkinson hastalığı
- p53 sinyal iletimi

İnhibisyon gruplarından elde edilen proteinler PANTHER programı aracılığıyla analiz edildiğinde aşağıda belirtilen sinyal iletim yollarının da bu proteinler aracılığıyla etkilendiği tespit edilmiştir.

- 5-Hidroksitriptamin bozunması
- ATP sentezi
- Adenin ve hipoksantin kurtarma sinyal örnekleri
- Adrenalin ve noradrenalin biyosentezi Alfa adrenerjik reseptör sinyal iletimi
- Alzheimer hastalığı-amiloid sekretaz sinyal iletimi
- Anjiyogenez

- G proteinleri ve beta-arrestin (P05911) aracılığıyla anjiyotensin II ile uyarılan sinyalleşme
- Apoptoz sinyal iletimi
- Netrin aracılı akson sinyal iletimi
- Semaforinlerin aracılık ettiği akson sinyal iletimi
- B hücresi aktivasyonu
- Beta1 adrenerjik reseptör sinyal iletimi
- Kan pıhtılaşması
- CCKR sinyalleşme haritası
- Cadherin sinyal iletimi
- Hücre döngüsü
- Kortikotropin salma faktörü reseptörü sinyal yolu
- Rho GTPase (P00016) tarafından hücre iskeleti düzenlemesi
- DNA replikasyonu
- Dopamin reseptörü aracılı sinyal iletimi
- EGF reseptörü sinyal iletimi
- Endojen kanabinoid sinyal iletimi
- Endotelin sinyal iletimi
- FAS sinyal iletimi
- FGF sinyal iletimi
- Fruktoz galaktoz metabolizması
- GABA-B reseptörü II sinyal iletimi
- Glutamin glutamat dönüşümü
- Glikoliz
- Gonadotropin salgılayan hormon reseptör yolu
- Heterotrimerik G-protein sinyal yolu-Gi alfa ve Gs alfa aracılı sinyal iletimi
- Histamin H1 reseptör aracılı sinyal iletimi
- Huntington hastalığı
- Kemokin ve sitokin sinyal yolunun aracılık ettiği iltihaplanma
- İnsülin/IGF yolu-protein kinaz B sinyal iletimi
- İntegrin sinyal iletimi
- İnterferon-gama sinyal iletimi

- İnterlökin sinyal iletimi
- İyonotropik glutamat reseptör sinyal iletimi
- Metabotropik glutamat reseptör sinyal iletimi
- Muskarinik asetilkolin reseptörü sinyal iletimi
- Nikotinik asetilkolin reseptörü sinyal iletimi
- Opioid prodinorfin sinyal iletimi
- Oksidatif stres tepkisi
- PDGF sinyal iletimi
- PI3 kinaz sinyal iletimi
- Parkinson hastalığı
- Plazminojen aktive edici sinyal iletimi
- Piridoksal fosfat kurtarma sinyal iletimi
- Piridoksal-5-fosfat biyosentezi
- Pirimidin Metabolizması
- Pirüvat metabolizması
- Ras sinyal iletimi
- Sinaptik vezikül sinyal iletimi
- T hücresi aktivasyonu
- TGF-beta sinyal iletimi
- Tirotropin salgılayan hormon reseptörü sinyal iletimi
- Ubikuitin proteazom sinyal iletimi
- VEGF sinyal iletimi
- B6 vitamini metabolizması
- Wnt sinyal iletimi
- p38 MAPK sinyal iletimi
- p53 sinyal iletimi

7. TARTIŞMA

Gerçekleştirilen bu tezde nükleer reseptör ailesinin üyesi olan ve birbirinin izomorfı olarak çalışan Rev-Erb α ve Rev-Erb β proteinlerinin, travmatik beyin hasarındaki rolünün araştırılması hedeflenmiştir. Literatürde akut CNS yaralanmalarının patogenezinde sirkadiyen proteinlerin rolünü incelemek için oluşturulan deney modellerinde sirkadiyen proteinin aktivitesini değiştirmek için ya farmakolojik ajanlar ya da ilgili sirkadiyen proteinin genin baskılandığı transgenik hayvan modelleri kullanılmıştır. Protein etkinliğini değiştirmeye yönelik bu iki tekniğin de dokuya özgü olmaması ve sirkadiyen olmayan etkilerinin ayırt etmenin zor olması beyni etkileyen hastalıklar hakkında yanıltıcı yönlendirmeler yapmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda deney hayvanlarında RevErb α ve RevErb β protein ifadelerini azaltıp ve artırabilmek için gen transferine olanak sağlayan viral vektör metodu uygulandı. Kan beyin bariyerini geçmemesi bu sayede yapılan analizlerin beyin dokusuna özgü olmasını sağlayan, diğer vektörlere oranla uzun süre transgen ekspresyonu sahip olması ve MSS hücrelerini kolay bir şekilde enfekte edilebilmesi sebebiyle lentiviral vektörler tercih edilmiştir. Çalışmanın belirlenen hedeflerine ulaşabilmesi için Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α + Lv-RevErb β , scRNA, sh-RevErb α , sh-RevErb β , sh-RevErb α + sh-RevErb β 8 deney grubu oluşturuldu. Yapılan moleküler klonlama deneylerini takiben üretilen virüs partikülleri (Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α + Lv-RevErb β , scRNA, sh-RevErb α , sh-RevErb β , sh-RevErb α + sh-RevErb β) fare nöroblastoma hücre hattına uygulandı ve hücrelerin %90 'dan fazlasının enfekte olduğu gösterildi. Daha sonrasında enjeksiyon sonrasında Rev-Erb α ve Rev-Erb β protein seviyelerinin etkili ve hedeflenen doğrultuda değişimi Western blot yöntemiyle gösterildi. Bu bilgiler dahilinde, yapılan moleküler klonlama çalışmalarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve RevErb α ve RevErb β protein seviyesini etkili ve hedeflenen doğrultuda değiştirdiği gösterilmiştir.

Protein seviyesini arttırmak veya azaltmak için üretilen virüslerin etkinlikleri ve güvenilirlikleri gösterildikten sonra virüsler farelerin korteks bölgesine Lv-GFP, Lv-RevErb α , Lv-RevErb β , Lv-RevErb α + Lv-RevErb β , scRNA, sh-RevErb α , sh-

RevErb β , sh-RevErb α + sh- RevErb β beyin içi enjeksiyon yöntemiyle verilmiştir. Virüs enjeksiyonundan sonra lentivirüslerin istenilen alanı enfekte edebilmesi ve en yüksek verimliliğin sağlayabilmesi yaklaşık olarak 7-10 gün sürmektedir (128,129). Deneysel gruplarının beyin içi enjeksiyon sonra 10 gün beklendi ardından travmatik beyin hasarı operasyonları gerçekleştirildi. Farelerde travmatik beyin hasarı oluşturmak için klinikle benzer patofizyolojiye sahip ve literatürde rutin uygulaması olan soğukla indüklenen travmatik beyin hasarı modeli kullanıldı. Çalışmamızda TBH patofizyolojindeki ikincil hasarın değerlendirilmesi amaçlandığı için önceki çalışmalarda gösterildiği gibi hasar sonrası 72 saat geçmesi beklendi.

TBH operasyonundan 72 saat sonra Rev-Erb α ve Rev-Erb β 'nın TBH akut dönemde gelişen lokomotor aktivite, nörolojik hasar, beyin hasarı, beyin ödem ve kan-beyin bariyeri geçirgenliği üzerine olan etkilerinin detaylı bir şekilde araştırıldı. Ayrıca bu etkilerin oluşmasında etken proteinlerin geniş ölçekli proteomik analizlerle belirlenip Rev-Erb α/β 'nın hücre içi sinyal iletim yolları üzerine olan etkilerini belirlendi.

Kan beyin bariyerinin yapısal bütünlüğünün bozulması hasarı takiben saatler içinde meydana gelen erken bir olaydır. Akut MSS hasarını takiben BBB bütünlüğündeki değişiklikler, beyin ödemi ve artmış kafa içi basıncı (ICP) gibi hayatı tehdit eden komplikasyonların gelişmesine neden olur. Beyin hasarını takiben oluşan kan-beyin bariyerinin (KBB) bozuklukları, doku kesitlerinde immünohistokimyasal yöntemlerle tespit edilebilen serum proteinlerinin ekstrasvazasyonuna yol açar. Literatürde Immüoglobulin G (IgG) ekstrasvazasyon, travmatik beyin hasarının (TBH) sonrası hayatta kalanların beyinlerinde 1 yıl sonra ve TBH'in akut fazı sırasında ölen hastaların beyinlerinde tespit edilmiştir (139). Bu sebeple çalışmamızda KBB geçirgenliğindeki değişimi değerlendirmek için IgG ekstrasvazasyon analiz yöntemini kullandık. Çalışmamızda RevErb α , RevErb β ve RevErb α - RevErb β protein ifadelerinin arttığı gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede hasar sonrası KBB geçirgenliğinin korunduğu gözlemlendi. Ayrıca RevErb α , RevErb β ve RevErb α/β protein ifadelerinin azaldığı gruplarda hasar sonrası KBB geçirgenliğinin kontrol grubuna oranla arttığı gözlemlendi. Bu bulgular RevErb β proteinlerin hasar takiben oluşan KBB bozulmasını önleyebileceğini göstermektedir. KBB bütünlüğünün erken

restorasyonu, travma sonrası epilepsi (PTE) ve nörodejeneratif hastalık gibi TBH ile ilişkili diğer komorbiditelerin sekellerinin önlenmesine de yardımcı olabilir.

Apoptotik hücre ölümü travmatik beyin hasarının patofizyolojisinde önemli bir rolü vardır ayrıca TBH'li hastaların yaklaşık %43'ünde aşırı aktif nöronal apoptozun uzun süreli işlev bozukluklar neden olduğu gözlemlenmiştir (140,141). Bununla birlikte literatürde RevErb α proteiniyle nöronal apoptozun ilişkisi olduğuna dair birçok çalışma mevcuttur. Örneğin, NR1D1 mutant farelerin serebellumundaki nöronların apoptozunda önemli bir artış olduğunu raporlanmıştır. Bir başka çalışmada, Rev-Erba silinen farelerde 6- hidroksidopamin tarafından indüklenen substantia nigra pars compacta'daki (SNpc) dopaminerjik nöronal kaybının arttığını gözlemlenmiştir (116). Bu çalışmalar, Rev-Erba eksikliğinin beynin bazı bölgelerinde doğrudan veya dolaylı olarak nöronal hasara neden olabileceğini düşündürmektedir. Biz de çalışmamızda RevErb proteinlerinin TBH gerçekleşen farelerde apoptozu nasıl etkilediği araştırmak için TUNEL metodu kullandık. TUNEL analizi, apoptoz sonucu oluşan DNA kırıklarına, TUNEL setinin içeriğinde bulunan, floresan molekülle işaretlenmiş d-UTP'lerin bağlanması ve floresan mikroskop altında ilgili dalga boyunda ışıkla uyarıldığında ışımaya vermesi prensibine dayanır. Böylece, DNA kırıklarının işaretlenmesinden yararlanılarak apoptoz hakkında analiz yapılabilmektedir. Çalışmamız sonucunda RevErb β ve RevErb α ifadesinin baskılanması sonucu oluşan gruplarda TUNEL (+) hücrelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Buna karşın RevErb α , RevErb β , RevErb α/β ifadesinin artmasıyla oluşan gruplarda kontrol grubuna göre TUNEL (+) hücre azalmıştır fakat istatistiksel bir anlamlılık göstermemiştir. Bu analizler, literatürdeki çalışmalarla tutarlı bir şekilde RevErb proteinlerinin TBH sonrası nöronal apoptoz üzerinde rolünü destekler niteliktedir.

TBH sonrası nöronal sağkalımı değerlendirebilmek için nöron hücrelerinin çekirdeklerindeki nörona özgü NeuN antijenleri NeuN antikorları vasıtasıyla immünofloresan olarak boyanmıştır. Yapılan çalışmamızda RevErb α , RevErb β ve RevErb α/β ifadelerinin arttırılması sonucu oluşturulan gruplarda nöronal sağkalımın anlamlı derecede arttırdığı bununla paralel RevErb α , RevErb α/β , RevErb β protein baskılanması sonucu oluşan gruplarda ise nöronal sağkalımın azaldığı görülmüştür. Bu bulgular RevErb proteinlerinin TBH sonrası patolojik süreçte nöroprotektif etkisi olabileceğini göstermektedir.

RevErb proteinlerinin değişiminin TBH sonrası oluşan hasar hacmini üzerindeki etkisini inceleme için cresyl violet boyaması protokolü uygulandı. Cresyl violet nöronlardaki Nissl cisimlerini boyayarak hasar hacmini değerlendirmemizi sağladı. Çalışmamız sonucu RevErb α / β ve RevErb β ifadelerinin artımının gerçekleştiği Lv-RevErb α / β ve Lv- RevErb β gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede hasar hacminin azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca RevErb α / β ve RevErb β ifade baskılanmasıyla oluşturan Sh-RevErb α + Sh-RevErb β ve Sh-RevErb β gruplarında scRNA grubuna göre anlamlı derecede hasar hacminin arttığı gözlemlenmiştir.

Bu alışmada, RevErb α ve RevErb β 'nın TBH sonrası patofizyolojik süreçteki oluşmasında etken proteinlerin geniş ölçekli proteomik analizlerle gerçekleştirildi. Analizlerimiz sonucunda, RevErb protein ifadelerinin artmasıyla oluşturulan gruplarla kontrol grubu olan Lv- GFP arasında protein ifadesinin artırımına bağlı olarak en az 1.4 kat değişen ve istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) lde değişen 46 protein olduğu belirlenmiştir. RevErb α / β inhibisyon gruplarına yapılan biyoinformatik analizlerde scRNA kontrol grubuna göre en az 1,4 kat değişen ve istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) lde 402 proteinin gösterilmiştir. Proje kapsamında elde ettiğimiz proteinlere yapılan biyoinformatik analizlerde RevErb α / β protein ifadesinin baskılanmasında veya ifadesinin artırılmasında Parkinson Hastalığı ve p53 sinyal iletim yolaklarında görevli olan proteinlerin de etkilendiği yaptığımız biyoinformatik analizlerle gösterilmiştir. İnhibisyon grubunda elde edilen protein sayısının yüksek olması nedeniyle bu gruplardan yapılan biyoinformatik analizlerde çok daha fazla sinyal iletim yolağı tanımlanmıştır. Özellikle Parkinson Hastalığına ek olarak Alzheimer ve Huntington Hastalıkları ile ilgili sinyal iletim yolaklarının da çıktığı görülmektedir. Literatürde yer alan birçok çalışmada gösterdiği üzere sirkadiyen ritim proteinleri nörodejeneratif hastalıkların mekanizmasında etkin bir şekilde rol oynamaktadır.

Proteomik analizler sonucunda Rev-Erb α / β baskılandığı gruplarda mitokondriyal proteinlerin ifadesinin azaldığı ve bu sebeple hücre enerji metabolizmasında yer alan birçok sinyal iletim yolağının etkilendiği görülmüştür. Oksidatif fosforilasyon kritik role sahip TCA siklsundaki Oksoglutarat (alfa-ketoglutarat) dehidrojenaz, sitrat sentaz, pirüvat karboksilaz enzimleri azalmıştır. Ayrıca, elektron taşıma sisteminde görevli NADH dehidrojenaz (Ndufa8, Ndufc2,

Ndufa9, Ndufs3), Sitokrom b-c1 (Ugrcr2, Ugcrb), Sitokrom c oksidaz (Cox5b), V-tipi proton ATPaz (Atp6v1d), ATP sentaz (Atp5f1 a-b-c) protein seviyeleri azalmıştır. TBH sonrası enerji üretimi oksidatif fosforilasyondan oksidatif fosforilasyona göre çok daha az verimli olan glikolize geçtiği bilinmektedir. Nöronal hasar sonrası ilk haftada, hastaların %56'sında hiperglikoliz meydana geldiği bildirilmiştir (142). Yetersiz oksidatif fosforilasyon, laktat üretiminde artış, asidoz, ödem, iskemi ve daha fazla nöronal hasarla sonuçlanır. Diğer yandan Literatürde Rev-Erb α/β 'nın hücre metabolizması etkisi üzerine yapılan çalışmalarda RevErb α 'nın baskılanmasının kas dokusunda oksidatif fosforilasyonu ve mitokondriyal biyogenezi azalttığı gösterilmiştir (118). Çalışmamızda gözlemlenen Mitokondriyal proteinlerde ve enerji metabolizmasında gözlenen değişiklikler, Rev-erb mitokondriyal fonksiyon üzerindeki rolünü gösteren önceki çalışmalarla tutarlıdır. Bu çalışmamız sonucunda Rev-Erb α/β baskılanmasıyla hasar alanı, nöronal ölüm gibi süreçlerin artması nedeninin mitokondriyal fonksiyon ve hücre metabolizması üzerindeki etkileri nedeniyle olabilir. Bununla birlikte, Rev-erb proteinlerinin TBH patofizyolojindeki etkisini aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

8. SONUÇ

Tüm bu sonuçlar bir arada incelendiğinde, literatürde ilk defa lentivirüsler aracılığıyla RevErb α , RevErb β ve/veya RevErb α/β protein seviyesindeki artışın veya azalışın TBH sonrasında gelişen nöronal hasar mekanizmaları üzerine etkileri incelenmiştir. RevErb β ve RevErb α/β 'nin travmatik beyin hasarı sonrasında, nöronal hücre ölümünü, kan beyin bariyeri geçirgenliğini ve DNA fragmentasyonunu etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca proteomik analizler aracılığıyla RevErb α/β 'nin travmatik beyin hasarı sonrasında etkilediği protein profili detaylı bir şekilde gösterilmiştir. Proteomik analizler vasıtasıyla tespit edilen proteinlerin hem sirkadiyen ritim hem de travmatik beyin hasarı patofizyolojisinde önemli rollerinin olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda; sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde görev alan RevErb α/β 'nin başta TBH olmak üzere diğer nörodejeneratif süreçlerde de önemli rolünün olabileceği gösterilmiştir.

9. KAYNAKLAR

1. Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI. Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil.*91(11):1637-40,2010.
2. Harhangi BS, Kompanje EJO, Leebeek FWG, Maas AIR. Coagulation disorders after traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien)*,150(2):165-75,2008.
3. Büki A, Koizumi H, Povlishock JT. Moderate posttraumatic hypothermia decreases early calpain-mediated proteolysis and concomitant cytoskeletal compromise in traumatic axonal injury. *Exp Neurol.* 159(1):319-28,1999.
4. Yi JH, Hazell AS. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int.* 48(5):394-403,2006.
5. Stein SC, Chen XH, Sinson GP, Smith DH. Intravascular coagulation: a major secondary insult in nonfatal traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 97(6):1373-7,2002.
6. Burke LJ, Downes M, Carozzi A, Giguère V, Muscat GE. Transcriptional Repression by the Orphan Steroid Receptor RVR/Rev-erb β Is Dependent on the Signature Motif and Helix 5 in the E Region: Functional Evidence for a Biological Role of RVR in Myogenesis. *Nucleic Acids Res.*24(17):3481-9,1996.
7. Kojetin DJ, Wang Y, Kamenecka TM, Burris TP. Identification of SR8278, a Synthetic Antagonist of the Nuclear Heme Receptor REV-ERB. *ACS Chem Biol.* 6(2):131-4,2011.
8. Solt LA, Wang Y, Banerjee S, Hughes T, Kojetin DJ, Lundasen T, Shin Y, Liu J, Cameron MD, Noel R, Yoo SH, Takahashi JS, Butler AA, Kamenecka TM, Burris TP. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature.* 485(7396):62-8,2012.
9. Peeters W, van den Brande R, Polinder S, Brazinova A, Steyerberg EW, Lingsma HF, et al. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochirurgica* 157:1683–96, 2015.

10. Eme R. Neurobehavioral Outcomes of Mild Traumatic Brain Injury: A Mini Review. *Brain Sciences* 25;7(12):46,2017.
11. Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI. Position Statement: Definition of Traumatic Brain Injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 91:1637–40, 2010.
12. Rubiano AM, Carney N, Chesnut R, Puyana JC. Global neurotrauma research challenges and opportunities. *Nature* 527:S193–7,2015.
13. Pearn ML, Niesman IR, Egawa J, Sawada A, Almenar-Queralt A, Shah SB, et al. Pathophysiology Associated with Traumatic Brain Injury: Current Treatments and Potential Novel Therapeutics. *Cellular and Molecular Neurobiology* 37:571–85,2016.
14. Winkler EA, Minter D, Yue JK, Manley GT. Cerebral Edema in Traumatic Brain Injury. *Neurosurgery Clinics of North America* 27:473–88,2016.
15. Sorby-Adams A, Marcoionni A, Dempsey E, Woenig J, Turner R. The Role of Neurogenic Inflammation in Blood-Brain Barrier Disruption and Development of Cerebral Oedema Following Acute Central Nervous System (CNS) Injury. *International Journal of Molecular Science* 18:1788-95,2017.
16. Capone-Neto A, Rizoli SB. Linking the chain of survival: trauma as a traditional role model for multisystem trauma and brain injury. *Current Opinion in Critical Care* 15:290–94,2009.
17. Taylor CA, Bell JM, Breiding MJ, Xu L. Traumatic Brain Injury–Related Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths — United States, 2007 and 2013. *MMWR Surveillance Summaries* 66:1–16,2017.
18. Nguyen TD, Trinh TA, Bao S, Nguyen TA. Secondary structure RNA elements control the cleavage activity of DICER. *Nature Communications* ; 19;13(1),2022.
19. Dewan MC, Mummareddy N, Wellons JC, Bonfield CM. Epidemiology of Global Pediatric Traumatic Brain Injury: Qualitative Review. *World Neurosurgery* 291:497-509, 2016.

20. Nishimura K, Cordeiro JG, Ahmed AI, Yokobori S, Gajavelli S. Advances in Traumatic Brain Injury Biomarkers. *Cureus* 4;14(4):e23804,2022.
21. Robinson CP. Moderate and Severe Traumatic Brain Injury. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology* 27:1278–300,2021.
22. Englander J, Cifu DX, Diaz-Arrastia R. Seizures and Traumatic Brain Injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 95:1223–4,2014.
23. Wanner IB, Anderson MA, Song B, Levine J, Fernandez A, Gray-Thompson Z, et al. Glial Scar Borders Are Formed by Newly Proliferated, Elongated Astrocytes That Interact to Corral Inflammatory and Fibrotic Cells via STAT3-Dependent Mechanisms after Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience* 33:12870–86,2013.
24. Gaetz M. The neurophysiology of brain injury. *Clinical Neurophysiology* 115:4–18,2004.
25. Cernak I. Animal models of head trauma. *NeuroRX* 2:410–22,2005.
26. Bramlett HM, Dietrich WD. Long-Term Consequences of Traumatic Brain Injury: Current Status of Potential Mechanisms of Injury and Neurological Outcomes. *Journal of Neurotrauma* 32:1834–48,2015.
27. Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol.* 58(3):193-201,1957.
28. Olney JW. Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate. *Science* 164:719–21, 1969.
29. Choi D. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience* 7:369–79,1987.
30. Tasker RC. Spreading depolarisations and traumatic brain injury: time course and mechanisms. *The Lancet Neurology* 11(5):389-90, 2012.
31. Hinzman JM, Wilson JA, Mazzeo AT, Bullock MR, Hartings JA. Excitotoxicity and Metabolic Crisis Are Associated with Spreading Depolarizations in Severe Traumatic Brain Injury Patients. *Journal of Neurotrauma* 33:1775–83,2016.

32. Voglis G, Tavernarakis N. The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO Reports* 7:1104–10,2006.
33. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience* 14:383–400, 2013.
34. Nilsson P, Laursen H, Hillered L, Hansen AJ. Calcium Movements in Traumatic Brain Injury: The Role of Glutamate Receptor-Operated Ion Channels. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 16:262–70, 1996.
35. Wang Z, Li F, Wei M, Zhang S, Wang T. Circadian Clock Protein PERIOD2 Suppresses the PI3K/Akt Pathway and Promotes Cisplatin Sensitivity in Ovarian Cancer. *Cancer Management and Research*. 12:11897–908,2020.
36. Floyd CL, Gorin FA, Lyeth BG. Mechanical strain injury increases intracellular sodium and reverses Na⁺/Ca²⁺ exchange in cortical astrocytes. *Glia* 51:35–46,2005.
37. Mbye LH, Singh IN, Sullivan PG, Springer JE, Hall ED. Attenuation of acute mitochondrial dysfunction after traumatic brain injury in mice by NIM811, a non-immunosuppressive cyclosporin A analog. *Experimental Neurology* 209:243–53,2008.
38. Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC, Springer JE. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: Cause or effect of neuronal cell death? *Journal of Neuroscience Research* 79:231–9,2004.
39. Cheng G, Kong R, Zhang L, Zhang J. Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. *British Journal of Pharmacology* 167:699–719,2012.
40. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119:7–35,2009.
41. Kumar A, Loane DJ. Neuroinflammation after traumatic brain injury: Opportunities for therapeutic intervention. *Brain, Behavior, and Immunity* 26:1191–201,2012.

42. Palmer AM, Marion DW, Botscheller ML, Bowen DM, DeKosky ST. Increased transmitter amino acid concentration in human ventricular CSF after brain trauma. *Neuro Report* 6:153–6,1994.
43. Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 11:379–87,1990.
44. Nita DA, Nita V, Spulber St, Moldovan M, Popa DP, Zagrean A-M, et al. Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 5:163–70, 2001.
45. Bouma GJ, Muizelaar JP, Stringer WA, Choi SC, Fatouros P, Young HF. Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography. *Journal of Neurosurgery* 77:360–8,1992.
46. Marion DW, Darby J, Yonas H. Acute regional cerebral blood flow changes caused by severe head injuries. *Journal of Neurosurgery* 74:407–14,1991
47. Giri BK, Krishnappa IK, Bryan RM, Robertson C. Regional Cerebral Blood Flow After Cortical Impact Injury Complicated by a Secondary Insult in Rats. *Stroke* 31(4):961-967,2000.
48. Chalmers S, Nicholls DG. The Relationship between Free and Total Calcium Concentrations in the Matrix of Liver and Brain Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 278:19062–70,2003.
49. Nicholls D. Mitochondrial Dysfunction and Glutamate Excitotoxicity Studied in Primary Neuronal Cultures. *Current Molecular Medicine* 4:149–77,2004.
50. Durmaz R, Kanbak G, Akyüz F, Isiksoy S, Yücel F, Inal M, et al. Lazaroid Attenuates Edema by Stabilizing ATPase in the Traumatized Rat Brain. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien Des Sciences Neurologiques* 30:143–9,2003.
51. Mustafa AG, Singh IN, Wang J, Carrico KM, Hall ED. Mitochondrial protection after traumatic brain injury by scavenging lipid peroxy radicals. *Journal of Neurochemistry* 114(1):271-280,2010.

52. Whalen MJ, Clark RSB, Dixon CE, Robichaud P, Marion DW, Vagni V, et al. Reduction of Cognitive and Motor Deficits after Traumatic Brain Injury in Mice Deficient in Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 19:835–42,1999.
53. Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, Lee VMY, Neugebauer E, McIntosh TK. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol.* 147(6):1575-85,1995.
54. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26(4):239-57,1972.
55. Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis- necrosis morphological continuum. *J Comp Neurol* 378(1):70-87,1997.
56. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 281(5381):1305-8,1998.
57. Raghupathi R, Mehr MF, Helfaer MA, Margulies SS. Traumatic axonal injury is exacerbated following repetitive closed head injury in the neonatal pig. *J Neurotrauma.* 21(3):307-16,2004.
58. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, et al. Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 15(4):961-73,1995.
59. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell* 86:147–57,1996.
60. Choi DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends in Neurosciences* 18:58–60,1995.
61. Zipfel GJ, Babcock DJ, Lee J-M, Choi DW. Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. *J Neurotrauma.* 17(10):857-69,2000.

62. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gómez-Monterrey I, Castedo M, et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 183:1533–44,1996.
63. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* 91:479–89,1997.
64. Clark RSB, Kochanek PM, Watkins SC, Chen M, Dixon CE, Seidberg NA, et al. Caspase-3 Mediated Neuronal Death After Traumatic Brain Injury in Rats. *Journal of Neurochemistry* 74:740–53,2001.
65. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, et al. Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 192:571–80,2000.
66. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *Journal of Experimental Medicine* 184:1331–41,1996.
67. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441–6,1999.
68. Zhang X, Chen J, Graham SH, Du L, Kochanek PM, Draviam R, et al. Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale dna fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite. *Journal of Neurochemistry* 82:181–91,2002.
69. Raghupathi R, Fernandez SC, Murai H, Trusko SP, Scott RW, Nishioka WK, et al. BCL-2 Overexpression Attenuates Cortical Cell Loss after Traumatic Brain Injury in Transgenic Mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 18:1259–69,1998.
70. Clark RSB, Kochanek PM, Adelson PD, Bell MJ, Carcillo JA, Chen M, et al. Increases in bcl-2 protein in cerebrospinal fluid and evidence for programmed cell death in

infants and children after severe traumatic brain injury. *The Journal of Pediatrics* 137:197–204,2000.

71. Lai Y, Hickey RW, Chen Y, Bayur H, Sullivan ML, Chu CT, et al. Autophagy is Increased after Traumatic Brain Injury in Mice and is Partially Inhibited by the Antioxidant γ -glutamylcysteinyl Ethyl Ester. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 28:540–50,2007.
72. Barzó P, Marmarou A, Fatouros P, Hayasaki K, Corwin F. Contribution of vasogenic and cellular edema to traumatic brain swelling measured by diffusion-weighted imaging. *Journal of Neurosurgery* 87:900–7,1997.
73. Hanstock CC, Faden AI, Bendall MR, Vink R. Diffusion-weighted imaging differentiates ischemic tissue from traumatized tissue. *Stroke* 25:843–8,1994.
74. Marmarou A. Pathophysiology of traumatic brain edema: current concepts. *Acta Neurochir Suppl.* 86:7-10,2003.
75. Habgood MD, Bye N, Dziegielewska KM, Ek CJ, Lane MA, Potter A, et al. Changes in blood-brain barrier permeability to large and small molecules following traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci.* 25(1):231-8,2007.
76. Obrist WD, Langfitt TW, Jaggi JL, Cruz J, Gennarelli TA. Cerebral blood flow and metabolism in comatose patients with acute head injury. Relationship to intracranial hypertension. *J Neurosurg.* 61(2):241-53,1984.
77. Hernandez-Ontiveros DG, Tajiri N, Acosta S, Giunta B, Tan J, Borlongan C. Microglia Activation as a Biomarker for Traumatic Brain Injury. *Front Neurol.* 4:26-30, 2013.
78. Acosta SA, Tajiri N, Shinozuka K, Ishikawa H, Grimmig B, Diamond DM, et al. Long-term upregulation of inflammation and suppression of cell proliferation in the brain of adult rats exposed to traumatic brain injury using the controlled cortical impact model. *PLoS ONE.* 8(1):e53376,2013.
79. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 81(1):1-5,2007.

80. Hang CH, Shi JX, Li JS, Wu W, Hong XY. Concomitant upregulation of nuclear factor-kB activity, proinflammatory cytokines and ICAM-1 in the injured brain after cortical contusion trauma in a rat model. *Neurol India*. 53(3):312-7,2005.
81. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF. Closed head injury—an inflammatory disease? *Brain Res Rev*. 48(2):388-99,2005.
82. Bellander BM, Singhrao SK, Ohlsson M, Mattsson P, Svensson M. Complement Activation in the Human Brain after Traumatic Head Injury. *J Neurotrauma*. 18(12):1295-311,2004.
83. Fluiter K, Opperhuizen AL, Morgan BP, Baas F, Ramaglia V. Inhibition of the Membrane Attack Complex of the Complement System Reduces Secondary Neuroaxonal Loss and Promotes Neurologic Recovery after Traumatic Brain Injury in Mice. *J Immunol*. 192(5):2339-48,2014.
84. Muradashvili N, Lominadze D. Role of fibrinogen in cerebrovascular dysfunction after traumatic brain injury. *Brain Inj*. 27(13-14):1508-15,2013.
85. Morganti JM, Riparip LK, Rosi S. Call Off the Dogma: M1/M2 Polarization Is Concurrent following Traumatic Brain Injury. *PLoS One*. 11(1):e0148001,2016.
86. Ansari MA. Temporal profile of M1 and M2 responses in the hippocampus following early 24h of neurotrauma. *J Neurol Sci*. 357(1-2):41-9,2015.
87. Kumar A, Alvarez-Croda DM, Stoica BA, Faden AI, Loane DJ. Microglial/Macrophage Polarization Dynamics following Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 33(19):1732-50,2016.
88. Kim YH, Lazar MA. Transcriptional Control of Circadian Rhythms and Metabolism: A Matter of Time and Space. *Endocr Rev*. 41(5):707-32,2020.
89. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. *Neuron*. 67(2):181-98,2010.
90. Buhr ED, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol*. 217:3-27,2013.

91. Lee J, Kim DE, Griffin P, Sheehan PW, Kim DH, Musiek ES, et al. Inhibition of REV-ERBs stimulates microglial amyloid-beta clearance and reduces amyloid plaque deposition in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Aging Cell*. 19(2):20-28,2020.
92. Rambaud J, Triqueneaux G, Masse I, Staels B, Laudet V, Benoit G. Rev-erb α 2 mRNA encodes a stable protein with a potential role in circadian clock regulation. *Mol Endocrinol*. 23(5):630-9,2009.
93. Chellappa SL, Vujovic N, Williams JS, Scheer FAJL. Impact of Circadian Disruption on Cardiovascular Function and Disease. *Trends Endocrinol Metab*. 30(10):767-79,2019.
94. Maury E, Ramsey KM, Bass J. Circadian Rhythms and Metabolic Syndrome. *Circ Res*. 106(3):447-62,2010.
95. Pariollaud M, Lamia KA. Cancer in the fourth dimension: What is the impact of circadian disruption? *Cancer Discov*. 10(10):1455-64,2020.
96. Mulcahy D, Cunningham D, Crean P, Wright C, Keegan J, Quyyumi A, et al. Circadian variation of total ischaemic burden and its alteration with anti-anginal agents. *Lancet*. 2(8614):755-9,1988.
97. Parker JD, Testa MA, Jimenez AH, Tofler GH, Muller JE, Parker JO, et al. Morning increase in ambulatory ischemia in patients with stable coronary artery disease. Importance of physical activity and increased cardiac demand. *Circulation*. 89(2):604-14,1994.
98. Muller JE, Stone PH, Turi ZG, Rutherford JD, Czeisler CA, Parker C, et al. Circadian variation in the frequency of onset of acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 313(21):1315-22,1985.
99. Tofler GH, Gebara OCE, Mittleman MA, Taylor P, Siegel W, Venditti FJ, et al. Morning peak in ventricular tachyarrhythmias detected by time of implantable cardioverter/defibrillator therapy. *Circulation*. 92(5):1203-8,1995.

100. Suárez-Barrientos A, López-Romero P, Vivas D, Castro-Ferreira F, Núñez-Gil I, Franco E, et al. Circadian variations of infarct size in acute myocardial infarction. *Heart*. 97(12):970-6,2011.
101. Ahuja CS, Wilson JR, Nori S, Kotter MRN, Druschel C, Curt A, et al. Traumatic spinal cord injury. *Nat Rev Dis Primers*. 3(1):1-21,2017.
102. Povlishock JT, Katz DI. Update of neuropathology and neurological recovery after traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil*. 20(1):76-94,2005.
103. Lo EH, Albers GW, Dichgans M, Donnan G, Esposito E, Foster R, et al. Circadian Biology and Stroke. *Stroke*. 52:2180-90,2021.
104. Tischkau SA, Cohen JA, Stark JT, Gross DR, Bottum KM. Time-of-day affects expression of hippocampal markers for ischemic damage induced by global ischemia. *Exp Neurol*. 208(2):314-22,2007.
105. Boone DR, Sell SL, Micci MA, Crookshanks JM, Parsley M, Uchida T, et al. Traumatic Brain Injury-Induced Dysregulation of the Circadian Clock. *PLoS One*. 7(10):e46204,2012.
106. Gaudet AD, Fonken LK, Ayala MT, Bateman EM, Schleicher WE, Smith EJ, et al. Spinal cord injury in rats disrupts the circadian system. *eNeuro*. 2018;5(6):ENEURO.0328-18.2018
107. Sutton CE, Finlay CM, Raverdeau M, Early JO, DeCoursey J, Zaslona Z, et al. Loss of the molecular clock in myeloid cells exacerbates T cell-mediated CNS autoimmune disease. *Nat Commun*. 8(1):1-11,2017.
108. Esposito E, Li W, Mandeville ET, Park JH, Şencan I, Guo S, et al. Potential circadian effects on translational failure for neuroprotection. *Nature*. 582(7812):395-8,2020.
109. Druzd D, Matveeva O, Ince L, Harrison U, He W, Schmal C, et al. Lymphocyte Circadian Clocks Control Lymph Node Trafficking and Adaptive Immune Responses. *Immunity*. 46(1):120-32,2017.

110. Bonnelye E, Vanacker JM, Desbiens X, Begue A, Stehelin D, Laudet V. Rev-erb β , a new member of the nuclear receptor superfamily, is expressed in the nervous system during chicken development. *Cell Growth Differ.* 5(12):1357-65,1994.
111. Lazar MA, Hodin RA, Darling DS, Chin WW. A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erbA alpha transcriptional unit. *Mol Cell Biol.* 9(3):1128-36,1989.
112. Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N. Differential Control of Bmal1 Circadian Transcription by REV-ERB and ROR Nuclear Receptors. *J Biol Rhythms.* 20(5):391-403,2005.
113. Everett LJ, Lazar MA. Nuclear receptor Rev-erb α : up, down, and all around. *Trends Endocrinol Metab.* 25(11):586-92,2014.
114. Zhao Q, Khorasanizadeh S, Miyoshi Y, Lazar MA, Rastinejad F. Structural elements of an orphan nuclear receptor-DNA complex. *Mol Cell.* 1(6):849-61,1998.
115. Kojetin DJ, Burris TP. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 13(3):197-216,2014.
116. Kim YH, Marhon SA, Zhang Y, Steger DJ, Won KJ, Lazar MA. Rev-erb α dynamically modulates chromatin looping to control circadian gene transcription. *Science.* 359(6381):1274-7,2018.
117. Yin L, Lazar MA. The Orphan Nuclear Receptor Rev-erb α Recruits the N-CoR/Histone Deacetylase 3 Corepressor to Regulate the Circadian Bmal1 Gene. *Mol Endocrinol.* 19(6):1452-9,2005.
118. Woldt E, Sebti Y, Solt LA, Duhem C, Lancel S, Eeckhoutte J, et al. Rev-erb α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat Med.* 19(8):1039-46,2013.
119. Scheiermann C, Kunisaki Y, Frenette PS. Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 13(3):190-8,2013.

120. Baxter M, Ray DW. Circadian rhythms in innate immunity and stress responses. *Immunology*. 161(4):261-7,2020.
121. Pariollaud M, Gibbs JE, Hopwood TW, Brown S, Begley N, Vonslow R, et al. Circadian clock component REV-ERB α controls homeostatic regulation of pulmonary inflammation. *J Clin Invest*. 128(6):2281-96,2018.
122. Ahmad A, Crupi R, Campolo M, Genovese T, Esposito E, Cuzzocrea S. Absence of TLR4 reduces neurovascular unit and secondary inflammatory process after traumatic brain injury in mice. *PLoS One*.8(3):e58441,2013.
123. Laird MD, Shields JS, Sukumari-Ramesh S, Kimbler DE, Fessler RD, Shakir B, et al. High mobility group box protein-1 promotes cerebral edema after traumatic brain injury via activation of toll-like receptor 4. *Glia*. 62(1):26-38,2014.
124. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*. 162(1):1-11,2010.
125. Amir M, Chaudhari S, Wang R, Campbell S, Mosure SA, Chopp LB, et al. REV-ERB α Regulates TH17 Cell Development and Autoimmunity. *Cell Rep*. 25(13):3733-49, 2018.
126. Zhang T, Yu F, Xu H, Chen M, Chen X, Guo L, et al. Dysregulation of REV-ERB α impairs GABAergic function and promotes epileptic seizures in preclinical models. *Nat Commun*. 12(1):1-14, 2021.
127. Kelestemur T, Yulug B, Caglayan AB, Beker MC, Kilic U, Caglayan B, et al. Targeting different pathophysiological events after traumatic brain injury in mice: Role of melatonin and memantine. *Neurosci Lett*. 612:92-7,2016.
128. Beker M, Caglayan AB, Beker MC, Altunay S, Karacay R, Dalay A, et al. Lentivirally administered glial cell line-derived neurotrophic factor promotes post-ischemic neurological recovery, brain remodeling and contralesional pyramidal tract plasticity by regulating axonal growth inhibitors and guidance proteins. *Exp Neurol*. 331:113344,2020.

129. Hermann DM, Kilic E, Kügler S, Isenmann S, Bähr M. Adenovirus-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression protects against subsequent cortical cold injury in rats. *Neurobiol Dis.* 8(6):964-73,2001.
130. Kim N, Kim JY, Yenari MA. Pharmacological induction of the 70-kDa heat shock protein protects against brain injury. *Neuroscience.* 284:912-9,2015.
131. Ciftci E, Karacay R, Caglayan A, Altunay S, Ates N, Altintas MO, et al. Neuroprotective effect of lithium in cold- induced traumatic brain injury in mice. *Behav Brain Res.* 392:112731,2020.
132. Nieuwenhuis B, Haenzi B, Hilton S, Carnicer-Lombarte A, Hobo B, Verhaagen J, et al. Optimization of adeno-associated viral vector-mediated transduction of the corticospinal tract: comparison of four promoters. *Gene Ther.* 28(1):56-74,2021.
133. Caglayan B, Kilic E, Dalay A, Altunay S, Tuzcu M, Erten F, et al. Allyl isothiocyanate attenuates oxidative stress and inflammation by modulating Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways in traumatic brain injury in mice. *Mol Biol Rep.* 46(1):241-50,2019.
134. Beker MC, Caglayan B, Yalcin E, Caglayan AB, Turkseven S, Gurel B, et al. Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT. *Mol Neurobiol.* 55(3):2565-76,2018.
135. Haçariz O, Baykal AT, Akgün M, Kavak P, Sağıroğlu MŞ, Sayers GP. Generating a detailed protein profile of *Fasciola hepatica* during the chronic stage of infection in cattle. *Proteomics.* 14(12):1519-30,2014.
136. Serhatli M, Baysal K, Acilan C, Tuncer E, Bekpınar S, Baykal AT. Proteomic study of the microdissected aortic media in human thoracic aortic aneurysms. *J Proteome Res.* 13(11):5071-80,2014.
137. Yalcin E, Beker MC, Turkseven S, Caglayan B, Gurel B, Kilic U, et al. Evidence that melatonin downregulates Nedd4-1 E3 ligase and its role in cellular survival. *Toxicol Appl Pharmacol.* 379:114688,2019.

138. Kilic E, Reitmeir R, Kilic Ü, Caglayan AB, Beker MC, Kelestemur T, et al. HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Peri-Lesional Tissue Remodeling, and Contralesional Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia. *Front Cell Neurosci.* 8:422,2014.
139. Hay JR, Johnson VE, Young AMH, Smith DH, Stewart W. Blood-Brain Barrier Disruption Is an Early Event That May Persist for Many Years After Traumatic Brain Injury in Humans. *J Neuropathol Exp Neurol.* 74(12):1147-57,2015.
140. Su Y, Deng MF, Xiong W, Xie AJ, Guo J, Liang ZH, et al. MicroRNA-26a/Death-Associated Protein Kinase 1 Signaling Induces Synucleinopathy and Dopaminergic Neuron Degeneration in Parkinson's Disease. *Biol Psychiatry.* 85(9):769-81,2019.
141. Capizzi A, Woo J, Verduzco-Gutierrez M. Traumatic Brain Injury: An Overview of Epidemiology, Pathophysiology, and Medical Management. *Med Clin North Am.* 104(2):213-38,2020.
142. Bergsneider M, Hovda DA, Shalmon E, Kelly DF, Vespa PM, Martin NA, et al. Cerebral hyperglycolysis following severe traumatic brain injury in humans: a positron emission tomography study. *J Neurosurg.* 86(2):241-51,1997

10. ETİK KURUL ONAYI



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
03/02/2021	09		Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER

“Rev-Erb α/β ” nın Travmatik Beyin Hasarında Rolünün İncelenmesi.” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 5 yıl

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