



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**BMAL1' İN AKUT VE SUBAKUT DÖNEM TRAVMATİK  
BEYİN HASARINDA ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

ELİF SERTEL EVREN

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL-2022

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans ( ) Doktora ( X )

Anabilim Dalı : Sinirbilim

Öğrenci : Elif SERTEL EVREN

Tez Başlığı : Bmal1'in Akut ve Subakut Dönem Travmatik Beyin Hasarında Rolünün İncelenmesi

Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi/REMER

Sınav Tarihi : 23.06.22

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

### Danışman

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

### Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

### İmza

### Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof. Dr. Mehtap KAÇAR

Yeditepe Üniversitesi

Doç. Dr. Birsen ELİBOL

Bezmialem Vakıf 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. Nesrim 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.

Elif SERTEL EVREN

# İTHAF



*“Bu tez aileme  
ithaf edilmiştir.”*

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, bilgisini, emeğini, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen için tez danışmanım sayın Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ' a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca REMER Araştırma Merkezimizin yöneticisi Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e doktora sürecimde desteklerinden ve merkeze sağladığı imkanlardan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tüm doktora eğitim süresi boyunca hiçbir zaman bilgilerini eksik etmeyen, ihtiyacım olduğu her anda beni destekleyen cesaret veren, büyük bir sabır ve özveri ile beni yetiştiren, bana her zaman yol gösteren bir ömür boyu minnettar kalacağım sayın hocalarım Dr.Öğr.Üyesi Mustafa Çağlar BEKER'e, Dr.Öğr.Üyesi Ahmet Burak ÇAĞLAYAN'a, Dr.Öğr.Üyesi Berrak ÇAĞLAYAN'a, Dr.Öğr. Üyesi Merve BEKER' e, Dr.Öğr.Üyesi Taha KELEŞTEMUR'a çok teşekkür ediyorum.

Acısıyla tatlısıyla bir çok süreci beraber paylaştığımız ekip arkadaşlarım ve kıymetli dostlarım Aysun ÇAĞLAYAN'a, Dr. Nilay ATEŞ'e, uzun yıllar birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Serdar ALTUNAY'a, Zeynep BALÇIKANLI'ya, Mehmet Özgen ALTINTAŞ'a, İrem ÇULHA TAŞKIN' a teşekkür ederim.

MEDİTAM ailesine; Ekrem M. ÖZDEMİR' e, Ali ŞENBAHÇE' ye, Barış CEBECİ' ye, Caner BAL' a, Ömer KUZU' ya, Dicle DENİZ'e, doktora sürecinde bana her konuda yardımcı olan Büşra BATĞI' ye teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Mehmet Kaan EVREN' e, annem Semra SERTEL' e, babam Mustafa SERTEL' e, kardeşim Eslem SERTEL'e, tüm doktora sürecimi heyecanla takip eden dedem Sami SERTEL' e, desteklerinden dolayı Sena YILDIZ' a ve Uğur ÖZBAĞ'a, tüm aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ ONAY FORMU.....	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	ii
İTHAF .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ .....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
RESİMLER LİSTESİ.....	xiv
TABLolar LİSTESİ.....	xv
1- ÖZET .....	1
2- ABSTRACT .....	2
3-GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4-GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Travmatik Beyin Hasarı.....	5
4.1.1. Travmatik beyin hasarı çeşitleri.....	5
4.1.2. Travmatik beyin hasarı patofizyolojisi.....	6
4.1.2.1. Eksitotoksisite .....	6
4.1.2.2. Mitokondriyal disfonksiyon.....	7
4.1.2.3.Reaktif oksijen türlerinin salınması, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu.....	8
4.1.2.4. Nöroinflamasyon.....	8
4.1.2.5. Apoptotik hücre ölümü.....	9
4.2. Biyolojik Ritimler.....	9
4.2.1. Ultradiyen ritim.....	10
4.2.2. İnfradiyen ritim .....	10
4.2.3. Sirkannual ritim.....	11
4.2.4. Sirkadiyen ritim .....	11

4.2.4.1. Memelilerde sirkadiyen ritim ve süprakiazmatik nükleus.....	11
4.2.4.2. Sirkadiyen ritmin moleküler mekanizması.....	12
4.2.4.3. Bmal1 proteini ve hastalıklarla ilişkisi.....	14
<b>5-MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>16</b>
5.1. Deney Grupları, Deney Planı ve Deneyin Sonlandırılması .....	16
5.2. Moleküler Klonlama ve Lentivirüs Üretimi.....	18
5.2.1. Lentiviral vektörler.....	18
5.2.2. Lentiviral vektörlerin üretimi .....	20
5.2.3. Lentiviral vektörlerin yüksek miktarda üretilmesi, paketlenmesi ve titrasyonun belirlenmesi .....	30
5.3. Beyin İçi Enjeksiyon Yöntemiyle Virüslerin Verilmesi.....	32
5.4. Travmatik Beyin Hasarının İndüklenmesi .....	33
5.5. Davranış Deneyleri .....	34
5.5.1. Rotarod motor koordinasyon davranış testi.....	35
5.5.2. Kuyruktan asma davranış testi.....	35
5.5.3. Açık alan testi .....	35
5.6. Kroyostat Cihazı ile Beyin Kesimi.....	35
5.7. İmmün Boyamalar .....	36
5.7.1. Beyin ödemi ve hasar hacminin analizi.....	36
5.7.2. Nöronalsağkalım analizi.....	36
5.7.3. Apoptotik hücre tayini.....	37
5.8. Protein Çalışmaları .....	38
5.8.1. Protein izolasyonu.....	38
5.8.2. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi .....	39
5.8.3. Western blot.....	40
5.9. İstatistiksel Analizler .....	42
<b>6-BULGULAR .....</b>	<b>43</b>
6.1. Beyin içi enjeksiyonla kortekse verilen Bmal1 lentivirüslerin Bmal1 ifadesini arttırması ve azaltması.....	43
6.2. Davranış Deneyleri .....	44
6.2.1. Rotarod motor koordinasyon testi .....	44

6.2.2. Kuyruktan asma davranış testi.....	45
6.2.3. Açık alan testi .....	47
6.3. Beyin Ödemi ve Hasar Hacminin Analizi.....	49
6.4. Nöronal sağkalım Analizi .....	52
6.5. Apoptotik Hücre Tayini .....	54
6.6. Akut Dönem Western Blot Analizleri .....	57
6.6.1. $\beta$ -Aktin protein analizi .....	57
6.6.2. p-AKT protein analizi .....	58
6.6.3. p-Erk1/2 protein analizi .....	59
6.6.4. p-SAPK-JNK1/2 protein analizi .....	60
6.6.5. Bax protein analizi .....	62
6.6.6. Bcl-XL protein analizi .....	62
6.6.7. Bcl-XL/ Bax protein analizi .....	63
6.6.8. eNOS protein analizi .....	65
6.7. Subakut Dönem Western Blot ile Protein analizleri.....	66
6.7.1. $\beta$ -Aktin protein analizi .....	66
6.7.2. Gap43 protein analizi .....	66
6.7.3. Brevican protein analizi.....	68
6.7.4. Versican protein analizi.....	69
<b>7-TARTIŞMA .....</b>	<b>70</b>
<b>8-SONUÇ.....</b>	<b>79</b>
<b>9-KAYNAKLAR.....</b>	<b>80</b>
<b>10-ETİK KURUL ONAYI.....</b>	<b>93</b>
<b>11-ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>96</b>



## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionik asit
<b>ATP</b>	Adenozin trifosfat
<b>Bmal1</b>	Aryl hidrokarbon reseptör nükleer translokator-benzeri protein1
<b>bHLH/PAS</b>	Temel heliks- döngü- heliks/ Per-ARNT-SIM
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Kalsiyum klorür
<b>cDNA</b>	Komplementer deoksiribonükleik asit
<b>CK1<math>\epsilon</math></b>	Kazein kinaz1 epsilon
<b>CK1<math>\delta</math></b>	Kazein kinaz 1 delta
<b>Clock</b>	Sirkadiyen lokomotor çıktı döngü kaput protein
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>Cry</b>	Kriptom sirkadiyen regülatör
<b>DAI</b>	Difüz aksonal yaralanma
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DBP</b>	Albumin geni D-bölgesine bağlanan protein
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Distile su
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Çift distile edilmiş su
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modifiye besiyeri
<b>DNA</b>	Deoksiribo nükleik asit
<b>DPBS</b>	Dulbecco fosfat-tamponlu salin
<b>eNOS</b>	Endotelyal nitrik oksit sentaz
<b>Erk</b>	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
<b>FDA</b>	Amerikan Fedaral Gıda ve İlaç İdaresi
<b>HEK293T</b>	İnsan embriyonik böbrek 293T hücre hattı
<b>HRP</b>	Yaban turbu peroksidaz
<b>Gap43</b>	Büyüme ile ilgili protein 43
<b>GC içeriği</b>	Guanin sitozin içeriği
<b>GFP</b>	Yeşil floresan protein

<b>GTP</b>	Guanozin-5'-trifosfat bağlayıcı proteinler
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>iGluR</b>	İyonotropik glutamat reseptörleri
<b>JAK/STAT</b>	Janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
<b>kb</b>	Kilobaz
<b>LB</b>	Luria-Bertani besiyeri
<b>LH</b>	Luteinize edici hormon
<b>MAPK</b>	Mitojenle aktive olan protein kinazlar
<b>mGluR</b>	Metabotropik glutamat reseptörleri
<b>MHC II</b>	Majör histouyumluluk kompleksi II
<b>mRNA</b>	Haberci ribonükleik asit
<b>N2A</b>	Neuro2A fare nöroblastoma hücre hattı
<b>NCBI</b>	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Nükleer faktör interlökin-3-düzenleyici protein
<b>NeuN</b>	Nöronal nükleus
<b>NGS</b>	Normal keçi serumu
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartat
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>NOS</b>	Nitrik oksit sentaz
<b>N<sub>2</sub>O</b>	Diazot monoksit
<b>O<sub>2</sub></b>	Oksijen
<b>PBS</b>	Fosfat tamponlu salin
<b>PFA</b>	Paraformaldehit
<b>PDVF</b>	Polivinilidin florür
<b>Rev-Erb <math>\alpha/\beta</math></b>	Retinoik asitle ilişkili öksüz nükleer reseptör alfa/ beta
<b>RFP</b>	Kırmızı floresan protein
<b>ROR</b>	RAR ilişkili öksüz reseptör
<b>RORE</b>	Retinoik asit ile ilişkili öksüz reseptör yanıt elemanları
<b>rpm</b>	Dakikadaki devir sayısı

<b>RTH</b>	Retino-hipotalamik yol
<b>REM</b>	Hızlı göz hareketleri
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>siRNA</b>	Küçük interferans RNA
<b>TBS-T</b>	Tris-tamponlu salin-Tween 20
<b>TM</b>	Erime sıcaklığı
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tümör nekroz faktörü $\alpha$
<b>TUNEL</b>	Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP nick uç etiketlemesi
<b>V</b>	Volt



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2.4.1.1. Memeli sirkadiyen saat sisteminin bileşenleri .....	12
Şekil 4.2.4.2.1. Sirkadiyen ritmin moleküler mekanizması .....	14
Şekil 5.1. Deney planı.....	18
Şekil 5.2.1.1. Bmal1 ifadesinin artırılması için kullanılan lentiviral vektör ve kullanılan <i>Sall</i> ve <i>BamHI</i> restriksiyon enzimleri .....	19
Şekil 5.2.2.1. Bmal1 agaroz jel görüntüsü .....	24
Şekil 5.2.2.2. Hesaplanan konsantrasyonlara göre gerekli hacimleri belirleyen formül .....	27
Şekil 5.2.2.3. Transforme bakteri kolonilerden elde edilen plazmitlerin confirmasyonu .....	29
Şekil 5.2.3.1. Lentivirüs üretimi yapılırken HEK293T hücre mediumları toplandıktan sonra hücre petriplerinin görüntüsü .....	32
Şekil 5.3.1. Beyin içi enjeksiyon yöntemiyle virüslerin verilmesi.....	33
Şekil 5.4.1. Travmatik beyin hasarının indüklenmesi .....	34
Şekil 5.7.2.1. Nöronsağkalım hücre sayım şeması .....	37
Şekil 5.7.3.1. Apoptotik sayım şeması .....	38
Şekil 6.1.1. Beyin içi enjeksiyonla kortekse verilen Bmal1 lentivirüs ifadelerinin Western blot yöntemi ile protein düzeyinde gösterilmesi.....	43
Şekil 6.2.1.1. Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası motor koordinasyon üzerine olan etkisi .....	44
Şekil 6.2.1.2. Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası motor koordinasyon üzerine olan etkisi .....	45
Şekil 6.2.2.1. Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası depresyon üzerine olan etkisinin kuyruktan asma testi aracılığıyla değerlendirilmesi .....	46
Şekil 6.2.2.2. Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası depresyon üzerine olan etkisinin kuyruktan asma testi aracılığıyla değerlendirilmesi .....	46
Şekil 6.2.3.1. Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası lokomotor ve aktivite üzerine olan etkisinin açık alan testi aracılığıyla hareketsizlik süresinin değerlendirilmesi...47	
Şekil 6.2.3.2. Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası lokomotor aktivite üzerine olan etkisinin açık alan testi aracılığıyla hareketsizlik süresinin değerlendirilmesi. ....	48

<b>Şekil 6.2.3.3.</b> Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası lokomotor aktivite üzerine olan etkisinin açık alan testi aracılığıyla hareketlilik süresinin değerlendirilmesi. ....	48
<b>Şekil 6.2.3.4.</b> Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası lokomotor aktivite üzerine olan etkisinin açık alan testi aracılığıyla hareketlilik süresinin değerlendirilmesi. ....	49
<b>Şekil 6.3.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası akut dönem deney seti farelerden alınan koronal kesitlerden Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubunun hasar hacmi ve beyin ödemi analizi. ....	50
<b>Şekil 6.3.2.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası akut dönem deney seti farelerden alınan koronal kesitlerden Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunun hasar hacmi ve beyin ödemi analizi. ....	51
<b>Şekil 6.4.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası akut dönem deney seti farelerden alınan koronal kesitlerden Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubunun nöranalsağkalım analizi ....	53
<b>Şekil 6.4.2</b> Travmatik beyin hasarı sonrası akut dönem deney seti farelerden alınan koronal kesitlerden Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunun nöronalsağkalım analizi ....	54
<b>Şekil 6.5.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası akut dönem deney seti farelerden alınan koronal kesitlerden Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubunun DNA fragmantasyon analizi ile apoptotik hücre tayini ....	55
<b>Şekil 6.5.2.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası akut dönem deney seti farelerden alınan koronal kesitlerden Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunun DNA fragmantasyon analizi ile apoptotik hücre tayini ....	56
<b>Şekil 6.6.1.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile $\beta$ -Aktin protein analizi ....	57
<b>Şekil 6.6.2.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile p-Akt protein seviyesi değişimi.....	58
<b>Şekil 6.6.3.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile p-Erk1/2 protein analizi ....	59
<b>Şekil 6.6.4.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile p-SAPK-JNK1/2 protein analizi.....	61
<b>Şekil 6.6.5.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile Bax protein analizi ....	62

<b>Şekil 6.6.6.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile Bcl-XL protein analizi .....	63
<b>Şekil 6.6.7.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile Bcl-XL/Bax protein analizi .....	64
<b>Şekil 6.6.8.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile eNOS protein analizi.....	65
<b>Şekil 6.7.1.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası subakut dönem ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile $\beta$ -Aktin protein analizi.....	66
<b>Şekil 6.7.2.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası suakut dönem ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile Gap43 protein analizi.....	67
<b>Şekil 6.7.3.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası suakut dönem ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile Brevican protein analizi.....	68
<b>Şekil 6.7.4.1.</b> Travmatik beyin hasarı sonrası suakut dönem ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile Versican protein analizi.....	69

## RESİMLER LİSTESİ

<b>Resim 5.2.2.1.</b> Vortex cihazı.....	20
<b>Resim 5.2.2.2.</b> Santrifüj cihazı.....	20
<b>Resim 5.2.2.3.</b> Termal döngü cihazı.....	21
<b>Resim 5.8.1.1.</b> Protein homojenizatör cihazı .....	39
<b>Resim 5.8.2.1.</b> Qubit 3.0 Fluorometer cihazı.....	40
<b>Resim 5.8.3.1.</b> Dikey jel elektroforez sistemi .....	42
<b>Resim 5.8.3.2.</b> Yarı kuru (Semi-dry) transfer sistemi .....	42



## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 5.2.1.1</b> Dharmacon Firması Smartvector Lentiviral Mouse Arntl mCMV-TurboRFP hedef dizileri.....	19
<b>Tablo 5.2.2.1</b> cDNA reaktifleri ve hacimleri.....	21
<b>Tablo 5.2.2.2</b> cDNA termal döngü cihazı basamakları.....	22
<b>Tablo 5.2.2.3</b> Moleküler klonma işleminde kullanılan ileri primer.....	22
<b>Tablo 5.2.2.4</b> Moleküler klonma işleminde kullanılan geri primer.....	22
<b>Tablo 5.2.2.5</b> PZR reaksiyon bileşenleri.....	23
<b>Tablo 5.2.2.6</b> PZR reaksiyon basamakları.....	24
<b>Tablo 5.2.2.7</b> Restriksiyon enzimleri ile yapılan kesim reaksiyonu bileşenleri.....	25
<b>Tablo 5.2.2.8</b> Birleşme reaksiyonu bileşenleri ve miktarları.....	26
<b>Tablo 5.2.2.9</b> Restriksiyon reaksiyonu bileşenleri.....	29
<b>Tablo 5.2.3.1</b> A tüpü reaksiyon bileşenleri.....	31
<b>Tablo 5.2.3.2</b> B tüpü reaksiyon bileşenleri.....	31



## 1. ÖZET

### BMAL1'İN AKUT VE SUBAKUT DÖNEM TRAVMATİK BEYİN HASARINDA ROLÜNÜN İNCELENMESİ

Travmatik beyin hasarı, her yıl dünya çapında 50 milyondan fazla bireyi etkilemekle beraber bireylerde kalıcı ve geçici fiziksel etkilerin, nörolojik ve psikolojik sorunların da başlıca nedenlerinden biridir. İnsidansı yüksek olmasına rağmen şu anda Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı bir tedavi metodu bulunmamaktadır. Bmal1, sirkadiyen ritmin düzenlemesinde merkezi rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Parkinson, beyin felci gibi nörodejeneratif hastalıklarda etkili olan Bmal1'in, beyin hasarı ile meydana gelen mekanizmaların oluşmasını engellemeye yardımcı olduğu düşünülmektedir. Bmal1'in travma sonrası meydana gelen moleküler mekanizmalar üzerine etkisi henüz tam aydınlatılamamıştır. Bu tezde Bmal1'in travmatik beyin hasarı patofizyolojisindeki rolünün gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla lentivirüslerle Bmal1 ifadesi arttırılan veya azaltılan farelere soğuk ile indüklenen travmatik beyin hasarı uygulanmıştır. Bmal1 ifadesinin arttırılmasının nöronal sağkalımı arttırdığı, apoptotik hücre ölümünü, hasar hacmini ve beyin ödemi azalttığı; Bmal1 ifadesinin azaltılmasının ise nöronal sağkalımı azalttığı, apoptotik hücre ölümünü, hasar hacmini ve beyin ödemi arttırdığı gösterilmiştir. Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası p-Akt, p-Erk 1/2, p-SAPK/JNK 1/2, Bax, Bcl-XL, eNOS gibi hücresel sağkalımda, stres yanıtlarında, apoptotik mekanizmalarda görev alan ve Gap43, Brevican, Versican gibi aksonal büyüme ile ilgili proteinlere istatistiksel anlamlı bir etkisinin olduğu, depresyon, lokomotor aktivite ve motor koordinasyon üzerine ise herhangi istatistiksel anlamlı bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Elde edilen sonuçların literatürde lentiviral vektörler aracılığıyla protein ifadesi arttırılmış ve azaltılmış olan Bmal1'in hem akut dönem hem de subakut dönem travmatik beyin hasarı sonrası etkisinin aydınlatılmasına katkı sağlaması beklenilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Bmal1, lentiviral vektörler, sirkadiyen ritim, travmatik beyin hasarı

Bu tez TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı 121S013 nolu proje kapsamında yapılmıştır.

## 2. ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE ROLE OF BMAL1 IN ACUTE AND SUBACUTE PERIOD TRAUMATIC BRAIN INJURY

Traumatic brain injury affects more than 50 million individuals worldwide each year, and is one of the main causes of permanent and temporary physical effects, neurological and psychological problems in individuals. Despite the incidence is high, there is currently no specific treatment method approved by the US Food and Drug Administration (FDA). Bmal1 is a transcription factor that plays a central role in the regulation of the circadian rhythm. Bmal1 is known to play a role in neurodegenerative diseases such as Parkinson's and stroke, it is thought to help prevent the formation of mechanisms that occur with brain damage. The effect of Bmal1 on the molecular mechanisms that occur after trauma has not yet been fully elucidated. In this thesis, it is aimed to show the role of Bmal1 in the pathophysiology of traumatic brain injury. For this purpose, cold-induced traumatic brain injury was applied to mice which have increasing or decreasing Bmal1 expression induced by lentiviruses. According to the results, increased Bmal1 expression increased neuronal survival, decreased apoptotic cell death, injury volume, and brain edema; it has been observed that decreasing Bmal1 expression decreases neuronal survival, increases apoptotic cell death, injury volume and brain edema. A statistically significant effect of Bmal1 on proteins that play a role in cellular survival, stress responses and apoptotic mechanisms such as p-Akt, p-Erk 1/2, p-SAPK/JNK 1/2, Bax, Bcl-XL, eNOS after traumatic brain injury. It has been shown that it has a statistically significant effect on axonal growth-related proteins such as Gap43, Brevican, Versican, but has no statistically significant effect on depression, locomotor activity and motor coordination. It is expected that the results obtained will contribute to the elucidation of the effect of Bmal1, whose protein expression is increased and decreased by lentiviral vectors in the literature, after both acute and subacute traumatic brain injury.

**Keywords:** Bmal1, circadian rhythm, lentiviral vectors, traumatic brain injury

This thesis is funded by TUBITAK 1002 Short Term R&D Funding Program 121S013 project.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Morbidite, mortalite, kalıcı ve geçici fiziksel etkilerin önde gelen nedenlerinden biri olan “travmatik beyin hasarı” her yıl dünya çapında 50 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir (1-3). 2018 yılı itibariyle global travmatik beyin hasarı insidansının 100.000 kişide 939 vaka olduğu tahmin edilmekte ve bu nedenle de dünya çapında gelecek yıllarda tahmini 69 milyon insanın travmatik beyin hasarına maruz kalacağı ön görülmektedir (2). İnsidansı yüksek olmasına rağmen şu anda Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi onaylı herhangi spesifik bir tedavi metodu bulunmamaktadır (4). Travmatik beyin hasarı geçiren kişilerde hasar sonrası nörolojik, psikososyal sorunlar ve aynı zamanda uzun vadeli sakatlığa kadar değişen travma sonrası farklı komplikasyonlar görülebilmektedir (5, 6). Ayrıca travmatik beyin hasarı geçiren hastaların klinik semptomları için yapılan harcamalar ve buna bağlı sosyoekonomik sorunlar, sağlık sistemi ve toplum üzerinde de ağır bir yük oluşturmaktadır (7).

Sirkadiyen ritim, günlük fizyolojik fonksiyonlarımızın yanında patofizyolojik süreçlerde de önemli bir rol oynayan biyolojik bir saattir. Sirkadiyen genler beyinde ritmik olarak ifade edilmektedir ve dendritik regülasyon, reseptör trafiği, nöronal aktivite, hücre tipine özgü davranışları belirleme gibi beyin mekanizmalarının düzenlenmesinde görevlidir. Sirkadiyen sistemin depresyon, şizofreni, anksiyete, stres regülasyonu, yeme bozuklukları, alkolizm gibi çeşitli bozukluklarda ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda kritik bir rol oynadığı görülmüştür (8). Aryl hidrokarbon reseptör nükleer translokator-benzeri protein1 (Bmal1), sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde merkezi rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (9). Sirkadiyen Lokomotor Çıktı Döngü Kaput Protein (Clock) ve Bmal1 protein kompleksi, Kriptom (Kriptom Sirkadiyen Regülatör) (Cry1, Cry2) ve Period (Per1, Per2, Per3) sirkadiyen ritim kontrol genlerinin promotorü olan E-kutusu bölgesine bağlanarak sirkadiyen mekanizmanın düzenlenmesini sağlamaktadır (10). Sirkadiyen ritimde, dokuya özgü Bmal1 ifadesinin düzenlenmesi oldukça önemlidir. Bmal1 eksikliğinde (Bmal1<sup>-/-</sup>) kilo kaybı, infertilizasyon, kısa yaşam süresi gibi değişikliklerin görülmesinin yanı sıra periferik ritim kaybının da olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (11-13). Farelerde veya sirke sineğinde (*Drosophila melanogaster*) Bmal1’in silinmesi, davranışsal aktivite kaybına ve yaşlanma sürecine dahil olan reaktif oksijen türlerinin artmasına

sebepe olmuştur. Ek olarak, Bmal1 protein polimorfizminin Parkinson hastalığı riskini artırdığı da düşünülmektedir. Özellikle, birincil hücre kültüründe oksidatif hasar ve striatal nörodejenerasyonun kimyasal bir indükleyicisi ile tedavi edilen farelerde Bmal1 protein seviyelerinin azalmasının, artan nöron ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (14-17). Ayrıca önemli bir nörodejenaratif hastalık olan beyin felci vakalarının ortaya çıkmasının günün zaman dilimlerine göre farklılık gösterdiği, gece yarısı (00.00) iskemi / reperfüzyon hasarının artmış nöronal sağkalım oranı ve azalmış apoptotik hücre ölümüne neden olduğu, bununla birlikte Bmal1 protein ifadesinde de artış meydana geldiği gözlemlenmiştir (18).

Bu bilgiler kapsamında bu doktora tez çalışmasında hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda nöronlar, nöronal kök hücreler, astrositler, oligodendrositler ve glialar gibi merkezi sinir sisteminde bulunan birçok hücreyi başarılı ve etkili bir şekilde enfekte edebilen, etkili bir gen transferine aracılık eden lentiviral vektörler aracılığıyla Bmal1 protein seviyesi artırılmış veya azaltılmış farelerde gerçekleştiren soğuk ile indüklenen travmatik beyin hasarı modeli sonrasında Bmal1 proteininin akut dönem sonrası gelişen apoptotik hücre ölümüne, nöronal sağkalıma, hasar hacmine ve beyin ödemeine, hücre içi sinyal yollarına etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca subakut dönemde gerçekleştirilen davranış deneyleri vasıtasıyla motor koordinasyon, depresyon, lokomotor aktivite üzerine olan etkileri ve aksonal büyüme ile ilgili yapılan protein analizleri yardımıyla Bmal1'e bağlı olarak gruplar arasında değişen protein profilinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

## **4. GENEL BİLGİLER**

### **4.1. Travmatik Beyin Hasarı**

Her yaşta morbidite, mortalite, kalıcı ve geçici fiziksel etkilerin önde gelen nedenlerinden biri olan “travmatik beyin hasarı” her yıl dünya çapında 50 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir (1-3). 2018 yılı itibariyle global travmatik beyin hasarı insidansının 100.000 kişide 939 vaka olduğu tahmin edilmekte ve bu nedenle de dünya çapında gelecek yıllarda tahmini 69 milyon insanın travmatik beyin hasarına maruz kalacağı ön görülmektedir (2). Travmatik beyin hasarı geçiren kişilerde hasar sonrası nörolojik, psikososyal sorunlar ve aynı zamanda uzun vadeli sakatlığa kadar değişen travma sonrası farklı komplikasyonlar görülebilmektedir (5, 6). Travmatik beyin hasarının klinik özellikleri arasında uzun süreli koma, baş ağrısı, afazi, nöbetler, amnezi ve hasardan saniyeler ile dakikalar sonra ortaya çıkan saldırganlık ve anksiyete gibi davranış anormallikleri sayılabilir ve bu belirtilerin bazıları aylarca hatta yıllarca da devam edebilmektedir (1, 19). Ayrıca travmatik beyin hasarı geçiren hastaların klinik semptomları için yapılan harcamalar ve buna bağlı sosyoekonomik sorunlar, sağlık sistemi ve toplum üzerinde de ağır bir yük oluşturmaktadır (7).

#### **4.1.1. Travmatik beyin hasarı çeşitleri**

Fiziksel hakaret mekanizmalarına göre, travmatik beyin hasarı üç kategoriye ayrılabilir. Bunlar kapalı kafa travması, açık kafa travması ve penetran kafa travmasıdır. Kapalı kafa travması, genellikle motorlu araç kazaları, düşmeler ve spor faaliyetlerinden kaynaklanan kafaya künt bir cismin çarpmasının etkisiyle meydana gelir. Künt cismin temas kuvveti, çarpma sırasında oluşan titreşimler ve şoklar nedeniyle çarpma bölgesinin altındaki beyin dokularının sıkışmasına ve beyin kan akımının azalmasına neden olur. Travmatik beyin hasarı insidans oranı toplum arasında en yüksek olan travmatik beyin hasarı çeşididir. Açık kafa travması ise duranın açıldığı yaralanmaları tanımlar (7). Penetran kafa travması yabancı bir cismin kafatasına girip duradan geçip beyin parakimine girmesiyle ortaya çıkar. Beyin dokularının yırtılmasıyla fokal hasar, intrakraniyal kanama, serebral ödem ve iskemi meydana gelir. Penetran kafa travması solunum yetmezliği, pnömoni, hipotoni gibi akut tıbbi komplikasyonlarla ilişkilidir (20).

#### **4.1.2. Travmatik beyin hasarı patofizyolojisi**

Travmatik beyin hasarı patofizyolojisi ile ilişkili nöronal doku hasarları iki kategoriye ayrılmaktadır. Akut fiziksel hasarı ve geri dönüşü olmayan nekrotik hücre ölümünü içeren birincil hasar, travmatik beyin hasarı sonrası karakterize edilen iki fazdan ilkidir. Birincil beyin hasarı, beyaz madde yollarının tahribatı, aksonal yaralanma, kontüzyon ve hematoma ile sonuçlanır (21). Birincil hasar ilk yırtılma, kesme veya kanamayı içermesine rağmen, ikincil hasar mekanizmaları ilk yaralanmayı dramatik bir şekilde şiddetlendirebilir (22). İki tür birincil hasar mevcuttur. Bunlar fokal ve difüz birincil beyin hasarıdır. Çalışmalar, orta ile şiddetli hasara sahip travmatik beyin hasarı hastalarında her iki tip yaralanmanın bir arada bulunmasının yaygın olduğunu göstermekle birlikte difüz aksonal yaralanma (DAI) travmatik beyin hasarı vakalarının yaklaşık %70'ini oluşturur (23).

Birincil hasarı eksitotoksikite, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, nöroinflamasyon, akson dejenerasyonu ve apoptotik hücre ölümü gibi ikincil hasar mekanizmaları izlemektedir (24). İkincil hasar, birincil hasarın neden olduğu çoklu, paralel, etkileşimli ve birbirine bağlı biyolojik reaksiyonlar dizisidir (22).

##### **4.1.2.1. Eksitotoksikite**

Travmatik beyin hasarında kan beyin bariyerinin hasar görmesi ve birincil nöronal hücre ölümünün meydana gelmesiyle, presinaptik sinir terminallerinden glutamat ve aspartat gibi uyarıcı amino asitlerin aşırı salınımı gerçekleşir (25, 26). Aşırı glutamatın varlığı, glutamat taşıyıcılarında oluşan işlev bozukluğuna bağlı olarak glutamat geri alınımının başarısız olmasından kaynaklanmaktadır (7). Bu uyarıcı amino asitler, hem iyonotropik glutamat reseptörlerini (iGluR) hem de metabotropik glutamat reseptörlerini (mGluR) aktive ederek iyonotropik glutamat reseptörlerine glutamat bağlandığında sodyum, potasyum, kalsiyum iyonik akışına izin vererek nöronlarda membran depolarizasyonuna neden olur (27). AMPA ve NMDA reseptörlerinin aşırı glutamat tarafından hiperaktivasyonu, hücre dışı kalsiyum ve sodyum iyonlarının akışına izin vererek postsinaptik nöronlarda iyon homeostazını değiştirir. Hücre içi kalsiyumdaki NMDA kaynaklı artış kalsiyum/ kalmodulin bağımlı

protein kinaz II, mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK), protein fosfotaz gibi hücre sinyal moleküllerinin aktivasyonunu başlatır (28, 29). NMDA reseptörlerinin glutamat ile aktivasyonu, reaktif oksijen türlerinin ve nitrik oksit üretimini teşvik eder bu da sekonder hücre hasarını daha da şiddetlendirir (30, 31). İyonotropik glutamat reseptörlerinden (iGluR) farklı olarak, metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR) kalsiyum ve aşağı akış sinyallemesini Guanozin-5'-trifosfat (GTP) bağlayıcı proteinler aracılığıyla düzenlerler. mGluR'lerin stimülasyonu fosfolipaz C/ inositol-1,4,5-trifosfatın aktivasyonu ile hücre içi kalsiyum depolarından sitozole kalsiyum salınımını başlatır. Böylece hasarlı merkezi sinir sisteminde sinyal kaskatları tetiklenir (32). Eksitator nörotransmitterlerin büyük ölçüde salınmasına bağlı olarak glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması, post travmatik oksidatif strese ve uzun bir süre boyunca eksitotoksik hücre ölümüne yol açar, artan mortalite oranı ve kötüleşen 6 aylık nörolojik sonuç ile ilişkilidir (25, 33). Ayrıca sitozolde bulunan aşırı kalsiyum kalsineurin, kalpain ve kasapazlar gibi apoptotik hücre ölümüne neden olan bir dizi proteini de aktive eder. Kalsiyum ve reaktif oksijen türlerinin birikimi mitokondriyal fonksiyonun bozulmasına yol açarak kalsiyum ve reaktif oksijen türlerinin homeostazının düzenlenmesini etkiler (7).

#### ***4.1.2.2. Mitokondriyal disfonksiyon***

Mitokondriyal disfonksiyon, hücre ölümüne neden olan metabolik ve fizyolojik düzensizliklere yol açar. Hücre içi kalsiyum ve bazı iyonların aşırı miktarda mitokondriye akışı, reaktif oksijen türlerinin üretime, mitokondriyal membranın depolarizasyonuna ve ATP ( Adenozin trifosfat) sentezinin inhibisyona neden olur (34, 35). Bu durum elektron taşıma zincirinin bozulmasına ve oksidatif fosforilasyon süreçlerinin bozulmasına sebep olur. Böylece hücrenin hayatta kalması ve kalsiyum döngüsünün düzenlenmesi için gerekli olan metabolik reaksiyonlar bozulmuş olur. Travmatik beyin hasarı sonrası mitokondrinin elektron mikroskopu analizinde, mitokondri krista membranının bozulduğu ve membran potansiyeli kaybı gibi önemli yapısal hasarların meydana geldiği görülürken apoptotik hücre ölümünde çok önemli rol oynayan sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktör gibi mitokondriyal proteinlerinde sitozole salındığı belirlenmiştir (35, 36).

#### **4.1.2.3. Reaktif oksijen türlerinin salınması, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu**

Enzimatik süreçler, aktif nötrofiller, eksitotoksik yollar ve işlevsiz mitokondri gibi çeşitli süreçlerle birlikte travmatik beyin hasarını takiben endojen reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin üretimi de sürekli devam etmektedir (37). Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi ve endojen antioksidan mekanizmaların bozulması oksidatif stresle sonuçlanır (4). Bununla birlikte travmatik beyin hasarından sonra kalsiyum birikimi, nitrik oksit (NO) üretiminde görev alan nitrik oksit sentazların (NOS) aktivitesini de artırır. Aşırı nitrik oksit ve oksijenden türevlenen serbest süperoksit anyonları arasında gerçekleşen reaksiyon sonucunda stabil olmayan peroksinitrit (PN) oluşarak oksidatif hasara neden olur (38, 39). Oksidatif stres aynı zamanda hasar görmüş korteks ve hipokampüste bozulmuş sinaptik plastisite ile de ilişkili olmakla beraber travmatik beyin hasarından 24 – 48 saat sonra eş zamanlı olarak sinaptik proteinlerde de kayıp söz konusudur (40). Reaktif oksijen türleri sadece proteinler ve DNA ile değil membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitleri ile de reaksiyona girerek lipoperoksil radikalleri oluşturarak hücre membranına daha da fazla zarar verir (41).

#### **4.1.2.4. Nöroinflamasyon**

Travmatik beyin hasarı sonrası glia ve astrosit hücreleri ile etkileşime giren endotel hücrelerinden oluşan, kanla taşınan patojenlerin ve bağışıklık hücrelerinin beyne girişini önleyen kan beyin bariyerinin fonksiyonunda meydana gelen bozulmalar, dolaşımdaki nötrofillerin, monositlerin ve lenfositlerin hasarlı beyin parankimene sızmasına izin verir (42, 43). Nöroinflamasyon, endojen onarım mekanizmalarına müdahale ederek nöral hücre ölümünü artırır ve bağışıklık hücreleri, mikroglialar, sitokinler, kemokinler ve diğer enflamatuar moleküller aracılığıyla etki eder (44). İlk olarak hasarlı hücreleri onarmak ve beyni patojenlerin işgalinden korumak için bir enflamatuar yanıt aktive edilir (45). İnflamatuar yanıtın aktivasyonunu takiben enflamatuar hücreler, monositler, nötrofiller, lenfositler kan beyin bariyerini geçerek prostaglandinleri, proinflamatuar sitokinleri, diğer inflamasyon düzenleyicileri serbest bırakırlar. Ayrıca bu düzenleyiciler kemokinleri ve hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonlarını artırarak mikrogliaları ve bağışık hücrelerini beyne yönlendirir (46, 47). Makrofaj türevli olan mikroglia hücreleri, travmatik beyin hasarı başlangıcında



hasarın yayılmasını sınırlamak için sağlıklı ve yaralı dokuları ayırarak avantaj sağlar (48). Bununla birlikte, mikrogial aktivasyon aşırı hale gelmesi proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına ve düzenlenmesine, nörotoksik moleküllerin ve serbest radikallerin üretiminin artmasına ve majör histouyumculuk kompleksi sınıf II'nin (MHCII+) artmış ekspresyonuna neden olur (45, 49, 50). Proinflamatuvar sitokinler, tümör nekroz faktörü alfa (TNF $\alpha$ ), interlökin (IL1 $\beta$ , IL6, IL12 ve interferon $\delta$ ) salgılayarak kan beyin bariyerini zayıflatır ve böylece enflamatuvar yanıtı artırır (42, 45, 49, 51). Nörotoksik moleküllerin ve serbest radikallerin üretimi, ek hücre ölüm mekanizmalarını başlatır. MHCII+'nın aşırı ekspresyonu nörodejenerasyona katkıda bulunur. Glial hücreler, adhezyon moleküllerini yukarı akış sinyallemede regüle eden kemokinleri eksprese ederek inflamatuvar yanıtı da ayrıca katkıda bulunur (49, 50, 52). Astrositler ise aksonal onarımda yardımcı olan, hücre proliferasyonunu artıran, nöronal hayatta kalmaya yardımcı olan ve programlanmış hücre ölümünü inhibe eden nörotrofik faktörleri yukarı akış sinyallemede regüle etmek için travmatik beyin hasarı sonrası hasar bölgelerinde rol oynarlar, hücre dışı glutamat seviyelerini düzenleyerek glutamat eksitotoksitesini azaltırlar (48, 53, 54).

#### **4.1.2.5. Apoptotik hücre ölümü**

Nöronların ve oligodendrositlerin apoptotik hücre ölümü, sekonder beyin hasarının ayırt edici özelliklerinden biridir (55-57). Apoptotik hücre ölümü kaspaz ve kalpain adı verilen sistein proteazların aktivasyonu ile başlar. Ayrıca apoptotik süreçler ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK), p38 MAPK, janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK/STAT) gibi çeşitli nörokimyasal, Hücrel ve moleküler yolların etkileşimi ile de tetiklenebilir (58-61).

## **4.2. Biyolojik Ritimler**

Canlı organizmaların çoğu ritmik olarak oluşan dış uyarlardan etkilenir. Biyolojik ritimler, basit tek hücreli hücrelerde, karmaşık çok hücreli organizmalarda (bitkilerde, hayvanlarda ve insanda) hatta organizmanın sadece tümünde değil aynı zamanda organizmanın organlarında, dokularında, tek bir hücrede de bulunur (62). Canlı organizmalarda mevcut olan bu biyolojik ritimler gece-gündüz döngüsüne (ışık döngüsü), mevsimsel değişikliklere, sıcaklığa, canlıların besin ihtiyacına ve çevresel

koşullara göre değişiklik göstermektedir. Aynı zamanda bu biyolojik ritimler canlılara avantajlar sağlamakla birlikte hayatta kalım sürelerini de arttırmaktadır (63). Biyolojik ritimler, saniyede bir veya birkaç döngüden (nöronal aktivite, kalp atış hızı gibi) meydana gelen ritimlerden yılda bir oluşan döngülerden meydana gelen ritimlere (mevsimsel ritimler gibi kadar geniş bir frekans aralığını kapsar. Biyolojik ritimler periyod uzunluğuna göre ultradiyen (24 saatten az), sirkadiyen (24 saat), infradiyen (24 saatten fazla) sirkaannual yani mevsimsel veya yıllık ritimler (1 yıl) olarak sınıflandırılır (62).

#### **4.2.1. Ultradiyen ritim**

Ultradiyen ritimler, 24 saatten daha kısa genellikle 1 ile 12 saat arasında değişen biyolojik ritimleri ifade eder (64). İnsanlarda uyku sırasında hızlı göz hareketlerinin (REM) her 90 dakika bir tekrarlanması, luteinize edici hormon (LH) (her 0,5-3 saatte), büyüme hormonu (her 3 saatte) ve kortikosteron gibi çeşitli hormonların epizodik salgılama yapması, bazı küçük memelilerin gıda alımında kısa süreli davranışsal ritimler sergilemesi ultradiyen ritimlere örnektir (62). Birçok ultradiyen ritim gıda alımı, hormon salgılanması, idrar atılımı gibi metabolik süreçlerle ilişki olmakla birlikte ultradiyen ritim çeşitliliği fonksiyonel düzeyde de belirgindir. İnsanlarda ve primatlarda normal üreme işlevinin, hipotalamus tarafından gonadotropin salgılayan hormonun ve hipofiz tarafından luteinize edici hormonun salgılanmasının belirli bir ultradiyen zamanlamasına bağlı olması ultradiyen ritmin fonksiyonel düzeyde etkisine bir örnektir (62).

#### **4.2.2. İnfradiyen ritim**

İnfradiyen ritimler, bir günden uzun ancak bir yıldan daha kısa süreye sahip biyolojik ritimlerdir (65). Dişi memelilerde infradiyen ritim yumurtalılarıdaki fonksiyonel değişiklikler ile ilişkilidir. Bir infradiyen ritim örneği olan östrus, luteinize edici hormonun (LH) ve folikül uyarıcı hormonun (66) seviyelerindeki değişikliklerle indüklenir ve her memeli türü için karakteristik olan düzenli aralıklarla (farelerde ve sıçanlarda 4-5 günde bir, koyunlarda 13-20 günde bir) oluşur (67).

### 4.2.3. Sirkannual ritim

Birçok biyolojik aktivite ve üreme işlevi, sıcaklık, gün uzunluğu veya gıda bulunabilirliği gibi çevresel koşullarla, başarılı olma ihtimalinin en yüksek olduğu yılın bir zamanıyla sınırlıdır. Ek olarak, birçok davranışsal, fizyolojik ve morfolojik süreç, çevredeki mevsimsel değişimlerle doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili olan yıllık dalgalanmalara maruz kalır. Sirkannual ritimler, mevsimsel ve yıllık gerçekleşen ritimlerdir. Böceklerde görülen pupa ritmi, kuşların göç etmesi, kış uykusu döngüleri, toynaklı hayvanlarda üreme aktivitesi ve tüy dökme döngüleri sirkannual ritmin örnekleridir (68-71).

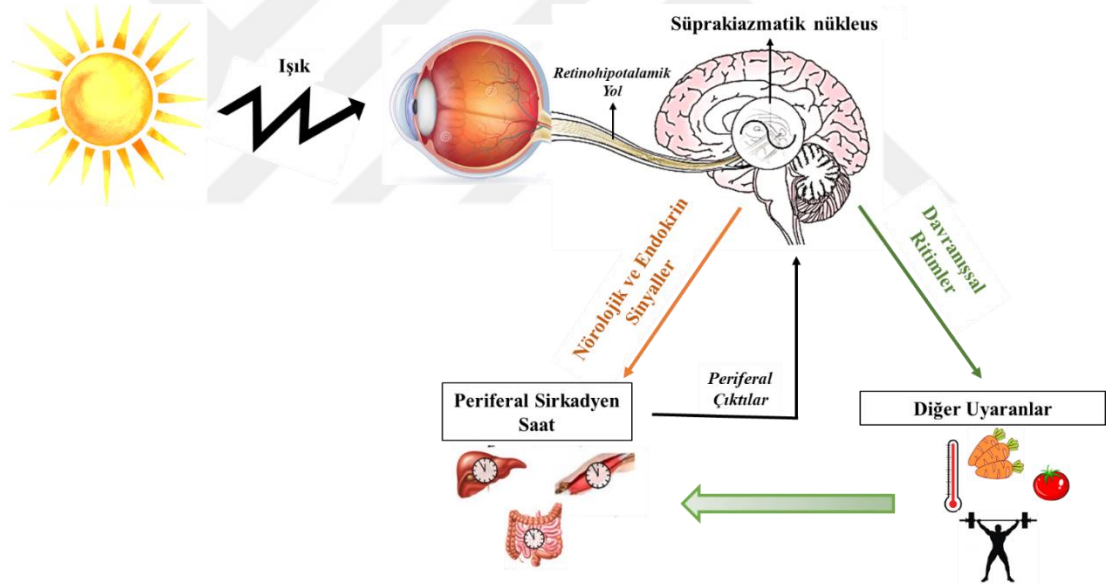
### 4.2.4. Sirkadiyen ritim

Tek hücreli organizmalardan bitkilere, bitkilerden hayvanlara ve insanlara kadar çok sayıda organizma fizyolojisini ve davranışlarını gün içerisinde güneş ile en uygun şekilde senkronize edebilen Latince yaklaşık bir gün anlamına gelen “*circa diem*” adı verilen içsel bir zamanlama sistemine sahiptir. İnsanlarda ve diğer memeli türlerinde, periyodik olarak tekrar eden çevresel değişikliklere adaptasyonda gelişen ve ritmik biyolojik işlevlerin yanı sıra yaklaşık 24 saatlik bir süre ile davranışsal çıktıları yönlendiren bu endojen sirkadiyen saat sisteminin iki temel karakteristilik özelliği vardır. Bu özelliklerden ilki aydınlık/karanlık döngüsü gibi dış etkenlerdeki salınımlardan bağımsız olarak devam eden yaklaşık 24 saatlik endojen ritmikliklidir. İkincisi ise ışık ve besin alınımı gibi dış etkenler tarafından değiştirilebilmesidir (72-76).

#### 4.2.4.1. Memelilerde sirkadiyen ritim ve süprakiazmatik nükleus

Memelilerde sirkadiyen sistem hiyerarşik olarak düzenlenmiştir (72). Bu hiyerarşinin en başında ön hipotalamusta optik kiazmanın üstünde bulunan ve binlerce nörona sahip olan (insanlarda ~50.000 ve sıçanlarda ~20.000 nöron) “ana sirkadyen saat” olarak adlandırılan süprakiazmatik nükleus gelmektedir (76-81). Süprakiazmatik nükleus sirkadiyen ritimi düzenler. Memeli sirkadiyen saat sistemi üç temel bileşenden oluşur: giriş sinyalleri (çevresel zamanlama işareti), sirkadiyen bir osilatör (ritim üretici) ve çıkış sinyalleri (açık ritim). Memeliler de dahil olmak üzere hayvanlarda, ışık sinyali esas olarak gözler tarafından algılanır (74). Işık, sirkadiyen osilatör için en

güçlü Zeitgeber (Almanca: "zaman veren") veya zaman işaretidir. Işık, retinal ganglion hücreleri (fotopigment melanopsin içeren), çubuk ve koni hücreleri tarafından tespit edilir ve bu sinyal, retino-hipotalamik yol (RHT) yoluyla süprakiazmatik çekirdeğe iletilir (82-86). Süprakiazmatik nükleusta üretilen sirkadiyen ritim hayvanların davranışını, fizyolojisini ve metabolik süreçlerini etkileyen nöronal veya hormonal sinyallere dönüştürülür (87) (Şekil 4.2.4.1.1). Ana sirkadiyen saat olan süprakiazmatik nükleus dışında sinir dokularında ve vücuttaki periferel dokularda (karaciğer, kalp, akciğer ve kas gibi) sirkadiyen ritim genleri eksprese edilir ve çoğu bir sirkadiyen ekspresyon salınımı sergiler (74, 88). Bu periferel sirkadiyen saatin sirkadiyen ritimleri kontrol etmede dokuya ve organa özgü rolleri vardır. Süprakiazmatik nükleusun aksine, bu periferel osilatörler doğrudan ışık tarafından uyarılmazlar. Bunun yerine süprakiazmatik nükleustan veya beslenme gibi diğer uyarılardan gelen çıkış sinyalleriyle periferel sirkadiyen ritmi kontrol ederler (74) (Şekil 4.2.4.1.1).

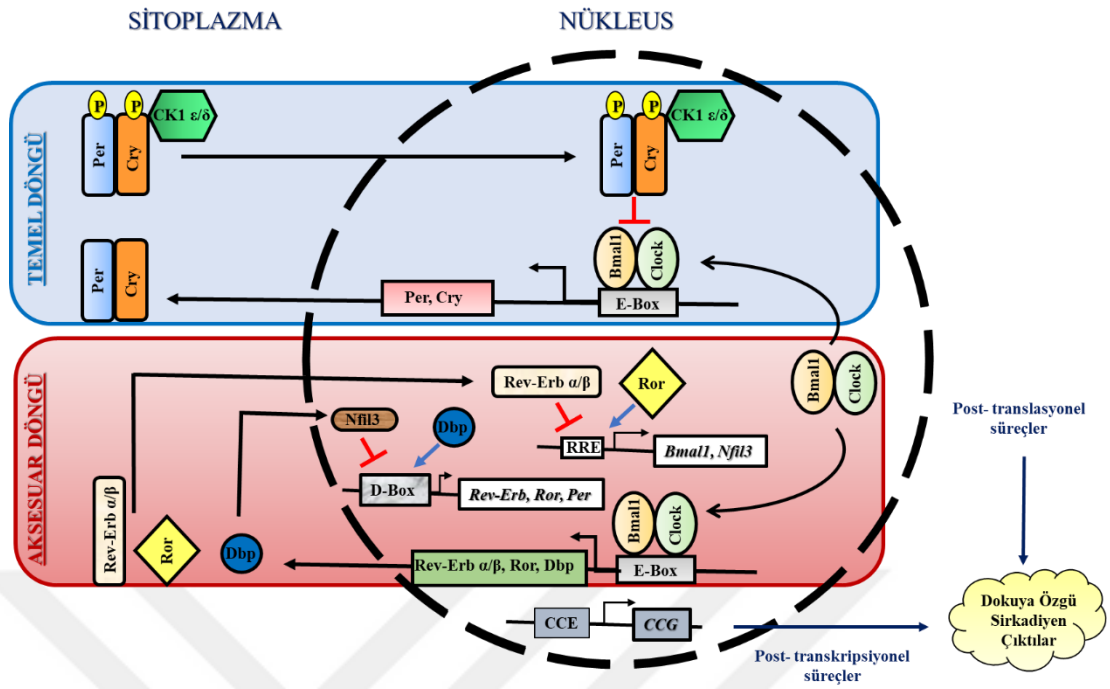


Şekil 4.2.4.1.1. Memeli sirkadiyen saat sisteminin bileşenleri

#### 4.2.4.2. Sirkadiyen ritmin moleküler mekanizması

Moleküler düzeyde sirkadiyen salınımlar, genler ve kendi protein ürünleri arasında iç içe geçmiş transkripsiyonel – translasyonel negatif geri bildirim döngüleri tarafından üretilir ve sürdürülür. Bu nedenle hücresel osilatörler hem kendi kendine devam eder hem de süreklidir (89). Temel döngü gen promoterlerindeki E-kutusu DNA dizilerine bağlanarak Period (Per1, Per2, Per3) ve Kriptom (Cry1, Cry2)

genlerinin ifadesini yönlendiren heterodimer Bmal1 ve Clock proteinlerinden oluşur. Yaklaşık 24 saatlik salınımları oluşturmak için gerekli belirli bir zamanın ardından, büyük makromoleküler protein komplekslerinin bir parçası olan Per ve Cry proteinleri nükleusa geri döner ve kendi aktivatörleri Bmal1'in ve Clock'un aktivitesini baskılar. Böylece negatif geri bildirim mekanizmasını tamamlanmış olur (72, 90, 91). Kazein kinaz 1 epsilon ve Kazein kinaz 1 delta (CK1 $\epsilon/\delta$ ), memelilerde sirkadiyen ritim protein dönüşümünü düzenleyen kritik faktörlerdir (92-95). Per ve Cry proteinlerinin CK1 $\epsilon/\delta$  ile etkileşimi, Per proteinlerinin miktarını, lokalizasyonunu ve yarı ömrünü düzenler. CK1 $\epsilon/\delta$  mutasyonları değişen sirkadiyen ritim ve uyku bozukları ile ilişkilidir (96, 97) (Şekil 4.2.4.2.1). Temel döngüye ek olarak, retinoik asitle ilişkili öksüz nükleer reseptörlerden (Ror ve Rev-Erb  $\alpha/\beta$  (NR1D1-2)), DBP ve Nfil3'den (E4BP4) oluşan aksesuar döngüleri mevcuttur. Clock ve Bmal1 heterodimerleri Ror ve Rev-Erb  $\alpha/\beta$  genlerinin transkripsiyonunu aktive ederek bu aksesuar döngüyü indükler. Ayrıca Ror ve Rev-Erb  $\alpha/\beta$  proteinleri Bmal1 promotöründe bulunan retinoik asit ile ilişkili öksüz reseptör yanıt elemanları (RORE's) aracılığıyla da Bmal1 protein ifadesini düzenler (98-102). Ror genleri Bmal1'in transkripsiyonunu aktive ederken Rev-Erb  $\alpha/\beta$  genleri transkripsiyonunu baskılar. Bu nedenle, Bmal1'in sirkadiyen salınımı, Ror ve Rev-Erb proteinleri tarafından hem olumlu hem de olumsuz olarak düzenlenir (98-101). Ek olarak, DBP ve Nfil3 proteinleri de, Rev-Erb, Ror ve Per genlerinin D-kutusu bağımlı gen ekspresyonunu rekabetçi bir şekilde düzenler (103, 104) (Şekil 4.2.4.2.1).



Şekil 4.2.4.2.1. Sirkadiyen ritmin moleküler mekanizması (72).

#### 4.2.4.3. Bmal1 proteini ve hastalıklarla ilişkisi

ARNTL, MOP3 olarak da adlandırılan Bmal1, Clock proteini ile heterodimerik bir kompleks oluşturan temel sarmal-döngü-sarmal (bHLH)/PAS ailesi transkripsiyon faktörü üyesidir. Clock proteini ile birlikte hedef genlerin yukarı akış düzenleyici bölgesinde bulunan E-kutusu elemanlarına bağlanarak Per1 ve Per2 gibi sirkadiyen ritim genlerinin transkripsiyonunu düzenler (105). Bu protein ailesi sinyalleme sürecindeki görevlerine göre iki alt gruba ayrılır: Sınıf I proteinler, çevresel sinyallerin sensörleri olarak işlev görürken; Sınıf II proteinleri, Sınıf I proteinleri ile dimerize olurlar. Bu iki grup arasındaki heterodimerizasyon, sadece fonksiyonel aktivasyon için değil, aynı zamanda transkripsiyonel çıktının belirlenmesi için de önemli bir adımdır. Filogenetik analizlerle Bmal1'in temel sarmal-döngü-sarmal (bHLH)/PAS ailesi Sınıf II üyesi olduğu gösterilmiştir (106, 107). Genom çapında yapılan profillemelere göre insan genomunda Bmal1'in metabolizmayı etkileyen proteinleri kodlayan tüm sirkadiyen ritim genleri ve diğer genler dahil olmak üzere 150'den fazla bölgeyi hedeflediği tahmin edilmektedir (108). Bmal1 eksikliği olan ( $Bmal1^{-/-}$ ) fareler, sirkadiyen ritim kaybı, azalmış vücut ağırlığı, kısırlık, ilerleyici artropati ve kısalmış yaşam süresi dahil olmak üzere çeşitli fenotipler sergiler (9, 11-13). Ayrıca bu fareler,

24 saatlik periyot boyunca zayıf bir uyku-uyanıklık ritmi gösterir (109). Bmal1 protein ifadesinin yokluğu, çok genç yaşta yüksek glikoz seviyeleri, bozulmuş glikoz toleransı ve azalmış insülin sekresyonuna neden olurken; karaciğer hedefli Bmal1 geninin silinmesi glukozla ilişkili genlerin aritmik gen ekspresyonuna, artmış glukoz klirensine ve açlık fazıyla sınırlı hipoglisemiye yol açar (110-112). Bmal1 yokluğunda anormal kardiyak elektrofizyolojiyle birlikte kan basıncı ve kalp hızında önemli ölçüde bozukluklar görülmektedir (113-115). Genellikle yaşamın sonraki aşamalarında ortaya çıkan Alzheimer ve Parkinson hastalığı, Bmal1 genindeki tek nükleotid polimorfizmi ile ilişkilendirilmektedir (116). Parkinson hastaları lökositleri sabah, akşam ve gece Bmal1 protein seviyeleri önemli ölçüde azalma göstermektedir. Ayrıca, Bmal1 seviyeleri ve Parkinson hastalığı şiddeti arasında da pozitif bir korelasyon mevcuttur (117). Bağışıklık yanıtında hayati rol oynayan reaktif oksijen türleri birden fazla doku tipinde Bmal1 tarafından düzenlenir ve Bmal1'in silinmesi, oksidatif stresin artmasına neden olan ve p hücrelerinin oksidatif stres kaynaklı ölümü nedeniyle pankreasta diyabetik bir fenotip oluşturan ileri yaşlanma fenotipini teşvik eder (118-120).

## 5. MATERYAL VE METOT

### 5.1. Deney Grupları, Deney Planı ve Deneyin Sonlandırılması

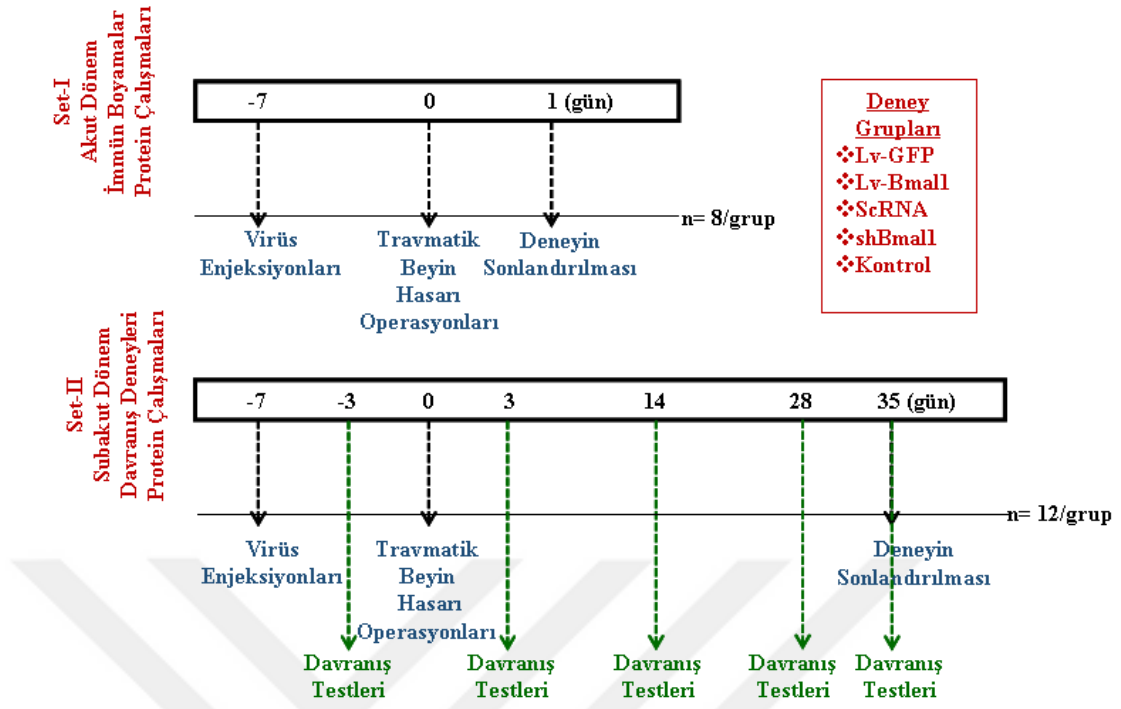
Bu tez kapsamında Bmal1'in akut ve subakut dönem travmatik beyin hasarında rolünün incelenebilmesi için farelere soğukla indüklenen beyin hasarı modeli uygulanmıştır. Çalışmanın belirlenen hedeflerine ulaşabilmesi için 5 deney grubu oluşturulmuştur. Deney grupları oluşturulurken moleküler klonlama teknikleri kullanılarak hedeflenen Bmal1 protein ifadesinin artırılıp azaltılmıştır. Bunun için fare Bmal1'in geninin kodlama bölgesi (*NCBI referans numarası: NM\_007489.4*) lentiviral vektörlere klonlanmıştır. Oluşturulan bu 5 deney grubu şöyledir:

- **Lv-GFP:** pLenti-EF1-GFP-2A-Puro vektörü (LV067, ABM) Bmal1 protein ifadesinin artırılması için kullanılan moleküler klonlamanın yapıldığı vektördür. Bu vektörün fare beyinde bir etkisinin olup olmadığının araştırılabilmesi için oluşturulan Lv-Bmal1 deney grubunun kontrol deney grubudur.
- **Lv-Bmal1:** Bmal1 aktivasyonunun etkilerini incelemek için oluşturulan deney grubudur. pLenti-EF1-GFP-2A-Puro vektörünün içerisine Bmal1 klonlanarak Bmal1 proteini aşırı miktarda ifade ettirilmiştir.
- **scrRNA:** Lentiviral Smartvector non-targeting mCMV-TurboRFP plazmitinin fare beyinde herhangi bir etkisinin olup olmadığının analizi için içerisine fare genomunda herhangi bir geni hedef almayan gen dizisi yerleştirilmiş sh-Bmal1 için kontrol grubudur.
- **sh-Bmal1:** Bmal1 gen dizisini hedef alarak Bmal1 protein seviyesi azaltılan deney grubudur.
- **Kontrol:** Kullanılan lentivirüslerin (pLenti-EF1-GFP-2A-Puro ve Smartvector non-targeting mCMV-TurboRFP) herhangi bir etkisinin olup olmadığının araştırılması için virüs partiküllerinin çözücüsü olan DPBS (Dulbecco's Fosfat-Buffer Salin) uygulanması için oluşturulmuş deney grubudur.

Deney hayvanları çalışmalarının tamamı etik standartlara, Helsinki Deklarasyonu'na, ulusal ve uluslararası kurallara uygun bir şekilde yapılmıştır. Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri



Yerel Etik Kurulu'ndan 20.08.2020 tarihli ve 38828770-772.02-E.40129 sayılı etik kurul onayı alınmıştır. Deney hayvanlarının temini ve bakımı İstanbul Medipol Üniversitesi MEDİTAM tarafından gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışma kapsamında Bmal1'in akut ve subakut dönem travmatik beyin hasarında rolünün incelenmesi için akut dönemi ifade eden Set-I ve subakut dönemi ifade eden Set-II olmak üzere iki deney seti tasarlanmıştır. Çalışmada Set-I Grup/n=8, Set-II grup/n=12 olacak şekilde toplamda 100 adet Balb/c fare kullanılmıştır. Fareler, travmatik beyin hasarının indüklenmesinden 7 gün önce virüs enjeksiyonuna tabi tutulmuştur. Virüs enjeksiyonlarının 7 gün sonrasında soğukla indüklenen travmatik beyin hasarı modeli oluşturulan gruplardaki tüm farelere uygulanmıştır. Set-I deney setinde Bmal1'in, soğukla indüklenen travmatik beyin hasarı akut döneminde etkisi incelenmiştir. Travmatik beyin hasarının indüklenmesinden 7 gün önce beyin içi enjeksiyon ile korteks bölgesine Lv-Bmal1, Lv-GFP, scrRNA, sh-Bmal1 veya DPBS enjeksiyonları yapılmıştır. 7 gün sonra travmatik beyin hasarı operasyonları gerçekleştirilmiştir. Akut dönem olarak ifade edilen Set-I deney grupları hasardan 24 saat sonra %4 izofloran (%30 O<sub>2</sub>, geri kalan N<sub>2</sub>O) ile derin anestezi uygulanarak sakrifiye edilmiştir (Şekil 5.1). Çıkarılan beyinler, kuru buz üzerinde dondurulmuştur. Örnekler analiz için -80°C'de saklanmıştır. Set-II deney seti subakut dönemi ifade etmektedir. Bu deney setinde kullanılacak farelerin normal koşullar altındaki davranışlarının gözlenebilmesi için fareler travmatik beyin hasarının indüklenmesinden 3 gün önce davranış testlerine tabi tutulmuştur. Hasardan sonra 3., 14., 28. ve 35. günlerde davranış testleri tekrarlanmıştır. Set-II deney grubu fareleri ise 35. gün davranış deneyleri yapıldıktan sonra %4 izofloran (%30 O<sub>2</sub>, geri kalan N<sub>2</sub>O) ile derin anestezi uygulanarak sakrifiye edilmiştir (Şekil 5.1). Çıkarılan beyinler, kuru buz üzerinde dondurulmuştur. Örnekler ileri analiz için -80 °C' de saklanmıştır.



Şekil 5.1. Deney planı

## 5.2 Moleküler Klonlama ve Lentivirüs Üretimi

### 5.2.1. Lentiviral vektörler

*In vitro* ve *in vivo* koşullarla uyumlu Bmall protein seviyesini arttırabilecek ve azaltabilecek iki lentiviral vektör kullanılmıştır. pLenti-EF1-GFP-2A-Puro lentiviral vektörü (LV067, ABM) (Şekil 5.2.1.1), Bmall protein seviyesi arttırabilmek için aynı zamanda GFP protein anlatımı içeren bisitronik vektördür. Bmall protein seviyesi azaltabilmek için ise Dharmacon firmasından RFP (Kırmızı Floresan Protein) protein anlatımını da içeren Smartvector Lentiviral Mouse Arntl mCMV-TurboRFP plazmiti satın alınmıştır. Bmall'ın ilgili vektörlerin içine klonlanması haricinde bir lentivirüsün üretilmesi için paketleme ve zarf plazmitleri de gereklidir. psPAX (12260, Addgene) paketleme plazmiti ve pMD2.G (12259, Addgene) ise zarf plazmiti olarak virüs partiküllerinin üretiminde kullanılmıştır.



### 5.2.2. Lentiviral vektörlerin üretimi

Hücre hattından toplam RNA izolasyonu, Neuro2A (N2A) fare nöroblastoma hücre hattından RNA izolasyon kiti (11828665001; High pure RNA isolation kit, Roche) kullanılarak yapılmıştır. Yaklaşık  $10^6$  hücre izolasyon için kullanılmıştır. Hücre besisi yerinden uzaklaştırılan hücreler 200  $\mu$ l PBS içerisinde çözüldükten sonra kitin içerisinde mevcut olan lizis solüsyonu kullanılarak hücreler vortex (Resim 5.2.2.1) yardımıyla parçalanmıştır. Sonrasında kitte mevcut olan filtrelili deney tüpleri sayesinde kitin protokolünde yer alana yıkama, santrifüj (Resim 5.2.2.2) gibi basamaklar sırasıyla takip edilerek en son “Elution” solüsyonu içerisinde toplam RNA elde edilmiştir. İzole edilen toplam RNA konsantrasyonu nanofotometre (P300, Implen, Almanya) ile ölçülmüştür.



Resim 5.2.2.1. Vortex cihazı (Heidolph)



Resim 5.2.2.2. Santrifüj cihazı (MicroCL 21, Thermo Scientific)

cDNA, komplementer DNA'dır. İzole edilen toplam RNA'dan cDNA sentezi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (04896866001, Roche) ve termal döngü cihazı (T100TM; Bio-Rad) (Resim 5.2.2.3) kullanılmıştır. Kitin protokolü takip edilerek reaksiyonlar RNA konsantrasyonu 1 µg/ µl ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Primerlerin denatürasyonu 10 dakika 65°C'de gerçekleştirilmiştir. Ters transkriptaz enzimi 5 dakika 85 °C'de inaktive edilmiştir. Tablo 5.2.2.1 ve Tablo 5.2.2.2' de reaksiyonda kullanılan reaktifler, hacimleri ve termal döngü cihazı basamakları gösterilmiştir.



**Resim 5.2.2.3** Termal döngü cihazı (T100 Thermal Cycler, Bio Rad)

**Tablo 5.2.2.1.** cDNA reaktifleri ve hacimleri

<b>Reaktifler</b>	<b>Hacim (µl)</b>
Toplam RNA (1µg/µl)	değişken
dNTP Karışımı	2 µl
RNase İnhibitörü	0,5 µl
5X Ters Transkriptaz Solüsyonu	4 µl
Ters Transkriptaz Enzimi	0,5 µl
Anchored Oligo dT Primerleri	1 µl
Random Primerleri	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	değişken
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

**Tablo 5.2.2.2.** cDNA termal döngü cihazı basamakları

Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)
65	10 dk
50	60 dk
85	5 dk
4	∞

İleri ve geri primer dizisi Fare Bmal1 geninin kodlama bölgesi (*NCBI referans dizisi: NM\_007489.4*) olan *Mus musculus* aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (Arntl), transcript variant 1, mRNA dizisi kullanılarak dizayn edilmiştir. Restriksiyon enzimleri kullanılan pLenti-EF1-GFP-2A-Puro vektörün çoklu klonlama bölgesinden seçilmiştir. Kesim için uygun olan *Sall* (GTCGAC) ve *BamHI* (GGATCC) restriksiyon enzim dizileri ileri ve geri primer dizilerinin başına eklenmiştir. Kullanılan ileri primer ve geri primer içerikleri Tablo 5.2.2.3 ve Tablo 5.2.2.4' te verilmiştir. Primerler için uygun olan Tm (Erime Sıcaklığı) değeri NEB Biolabs Tm Calculator programı kullanılarak hesap edilmiştir. 200 nm primer konsantrasyonu için 64 °C uygun Tm değerleri olarak belirlenmiştir.

**Tablo 5.2.2.3** Moleküler klonma işleminde kullanılan ileri primer

İleri Primer	
Dizi	5'- AGTCAGTCGACAATGGCGG ACCAGAGAATGG-3
Restriksiyon Enzimi	<i>Sall</i> (GTCGAC)
Toplam Uzunluğu	31 nükleotid
% GC İçeriği	%55
Tm Değeri (°C)	64 °C

**Tablo 5.2.2.4** Moleküler klonma işleminde kullanılan geri primer

Geri Primer	
Dizi	5'AGTCAGGATCCAACAGC GGCCATGGCAAGT-3'
Restriksiyon Enzimi	<i>BamHI</i> (GGATCC)
Toplam Uzunluğu	30 nükleotid
% GC İçeriği	%58
Tm Değeri (°C)	64 °C

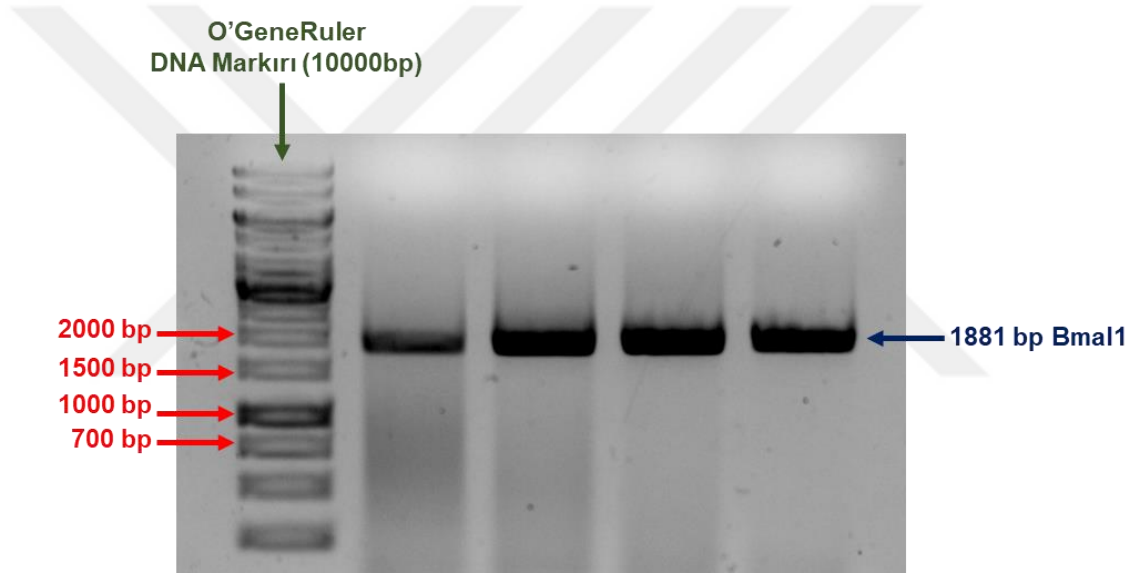
Fare Bmal1 geninin kodlama bölgesi (*NCBI referans dizisi: NM\_007489.4*) N2A cDNA'sı şablon olarak kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonu iProof High-Fidelity PCR Kit (172-5330, Bio-Rad Life Sciences Research) kullanılarak hazırlanmıştır. 0,2 mM primer konsantrasyonu PZR reaksiyonu için kullanılmıştır. Tablo 5.2.2.5'de PZR reaksiyon bileşenleri verilmiştir. PZR reaksiyonları Thermal cycler (T100TM; Bio-Rad Life Sciences Research) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyon basamakları Tablo 5.2.2.6'da gösterilmiştir. PZR sonrası PZR ürünleri 6X yükleme boyası (R0631; Thermo Fisher Scientific) kullanılarak %0,8 Agaroz jelde 120 V'ta 20 dakika yürütülmüştür. DNA belirleyicisi olarak 1 kb (O'GeneRuller-ready to use, Thermo Scientific) kullanılmıştır. Agaroz jel Biorad Chemidoc görüntüleme sistemi (1708280; Biorad Life Sciences Research) kullanılarak görüntülenmiş ve 1881 baz çiftine denk gelen Bmal1 DNA bantı belirlenmiştir. Şekil 5.2.2.1.' de Bmal1 DNA bantının agaroz jel görüntüsü verilmiştir.

**Tablo 5.2.2.5.** PZR reaksiyon bileşenleri

<b>Bileşenler</b>	<b>Hacim (µl)</b>
cDNA	1,0
İleri Primer (0,2 mM)	0,4
Geri Primer (0,2 mM)	0,4
iProof Polimeraz Enzimi	0,2
5X High Fidelity Solüsyonu	4,0
dNTP karışımı	0,4
dH <sub>2</sub> O	13,6
<b>Toplam</b>	<b>20,0</b>

**Tablo 5.2.2.6.** PZR reaksiyon basamakları (Toplam 35 döngü)

Basamak	Zaman	Sıcaklık
Başlangıç Denatürasyonu	60 s	98°C
Denatürasyon	10 s	98°C
Bağlanma	30 s	64 °C
Uzama	90 s	72°C
Son Uzama	5 dk	72°C
Bitiş	∞	4 °C



**Şekil 5.2.2.1.** Bmal1 agaroz jel görüntüsü

Agaroz jelde tespit edilen Bmal1 PZR ürünleri Pure Link Quick Gel Extraction Kit (K2100-12, Invitrogen) yardımıyla agaroz jelden izole edilmiştir. Agaroz jelden Bmal1 DNA bantları kesilip çıkartılarak bantın kütlesine uygun olarak kitin içinde bulunan L3 jel çözücü solüsyonu eklenmiştir. 50 °C'de 10 dk inkübe edilen karışım her 3 dakikada bir ters-düz yapılarak karıştırılmıştır. İnkübasyonun ardından üzerine izopronal eklendikten sonra kitin içerisinde mevcut olan kolonlu tüpler üzerine karışım eklenerek oda sıcaklığında 14.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Sonrasında kitte bulunan W1 yıkama solüsyonu ve protokole uygun santrifüj işlemleri



gerçekleştirilmiştir. Son olarak E5 elüsyon solüsyonu kullanılarak kolonda mevcut olan DNA 14.000 g'de 2 dk santrifüj sonrasında izole edilmiştir.

Elde edilen Bma1 DNA ürünü ve bisistronik vektör *Sall* (FD0644 Thermo Fisher) ve *BamHI* (FD0054 Thermo Fisher) kesim enzimleri kullanılarak kesilmiştir. 10X Fast Digestion Solüsyonu (B64, Thermo Scientific) kesim reaksiyonları için kullanılmıştır. Reaksiyon bileşenleri Tablo 5.2.2.7'de gösterilmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımları 37°C'de 45 dk inkübe edilmiştir. *Sall* restriksiyon enziminin aktivitesinin bloke edilmesi 65°C'de 10 dakikada gerçekleşirken *BamHI* restriksiyon enziminin aktivitesinin bloke edilmesi 80°C'de 5 dk'da gerçekleştirilmektedir. İki restriksiyon enziminin birlikte kullanılmasıyla enzimlerin aktivasyonun bloke edilmesi 80°C'de 10 dk inkübasyon sonucunda gerçekleştirilmiş, reaksiyon durdurulmuştur.

**Tablo 5.2.2.7.** Restriksiyon enzimleri ile yapılan kesim reaksiyonu bileşenleri

	<b>Lentiviral Vektör (µl)</b>	<b>Bma1 DNA (µl)</b>
Ürün	5,0 (1 µg/µl)	13,0
10X Fast Digestion Solüsyonu	2,0	2,0
<i>Sall</i>	0,5	0,4
<i>BamHI</i>	0,5	0,4
dH <sub>2</sub> O	12,0	4,2
<b>Toplam</b>	<b>20,0</b>	<b>20,0</b>

Zymo DNA Clean and Concentrate-5 kiti (D4013, Zymo Research) kullanılarak kesilen DNA ürününün ve vektörün restriksiyon enzimlerinden temizlenmiş ve kesilen ürünler geri kazanılmıştır. Kesim reaksiyonu sonrası elde edilen Bma1 DNA kesim ve p-lentiviral kesim ürünü üzerine 5:1 oranı olacak şekilde kitin içerisinde bulunan DNA Binding Solüsyonu eklenmiştir. Ardından kitin protokolüne uygun olarak kitin içerisinde mevcut bulunan kolonlu deney tüplerine

aktarılmıştır. Oda sıcaklığında 12.000 g'de 30 s santrifüj edilmiştir. Sonrasında 200 µl DNA Wash Solüsyonu eklenip 12.000 g'de 30 s santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrasında yeni 1,5 ml eppendorff deney tüplere aktarılan kolonlar üzerine önceden 50°C'de ısıtılmış elüsyon solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1 dk boyunca bu solüsyonla inkübe edilmiştir. Ardından 12.000 g'de 30 s santrifüj işlemi yapılarak kesilen Bma1 DNA ürününün ve lentiviral vektörün geri kazanımı gerçekleştirilmiştir. Ürünlerin konsantrasyonları NanoPhotometer cihazı (P300, Implen) kullanılarak ölçülmüştür.

*Sall* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesilen Bma1 DNA ürünü ve p-lenti vektörü T4 DNA ligaz enzimi içeren Rapid DNA Ligation kit (K1422, NEB Biolab) kullanılarak birleştirilmiştir. Birleşme reaksiyonunda 12 ng vektör kütlesi için gerekli olan vektör içine klonlanacak Bma1 DNA parçasının miktarı ve birleşme oranları NEBio Calculator Ligation Calculator (Version 1.9.0, NEB Biolabs programı kullanılarak Şekil 3.2.2.2.' te gösterilen formül ile hesaplanmıştır. 1:1, 3:1, 5:1, 7:1 (Bma1 / pLenti vektör birleşme oranları içerisinde klonlama işlemlerinde en çok tercih edilen 3:1 ve 5:1 (Bma1/ pLenti vektör) birleşme oran miktarlarına göre birleşme reaksiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımı 22 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Tablo 5.2.2.8'da birleşme reaksiyonu bileşenleri ve hacimleri gösterilmiştir.

**Tablo 5.2.2.8.** Birleşme reaksiyonu bileşenleri ve miktarları

	<b>3:1 Birleşme Oranı (µl)</b>	<b>5:1 Birleşme Oranı (µl)</b>
Lentiviral Vektör	0,5	0,5
Bma1 DNA parçası	1,37	2,29
T4 Ligaz Enzimi	0,5	0,5
5X Birleşme Reaksiyonu Solüsyonu	2,0	2,0
ddH <sub>2</sub> O	5,63	4,71
<b>Toplam</b>	<b>10,0</b>	<b>10,0</b>

Gerekli olan Bmal1 Kütlesi (g)	=	3 X Vektör kütlesi (g) X	$\frac{\text{Bmal1 uzunluğu}}{\text{pLenti vektör uzunluğu}}$
--------------------------------------	---	--------------------------	---

**Şekil 5.2.2.2.** Hesaplanan konsantrasyonlara göre gerekli hacimleri belirleyen formül

Kompetent bakteri hazırlamak için *Escherichia coli* bakterileri stb13 suşu, herhangi bir antibiyotik içermeyen katı LB agar (A8523, Biomatik) besiyeri plakasına yayılmıştır. İnkübasyon için 37 °C inkübatör içerisine yerleştirilmiştir. Ertesi gün, agar yüzeyinden bir koloni alınmış ve 5 ml LB sıvı besiyerine (A8523, Biomatik) konulmuştur. Hücreler bir gece boyunca 37 ° C'de 150 rpm'de çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Bu hücre süspansiyonundan, 100 ml LB sıvı besiyerine 1 ml alınarak ilave edilmiştir. 37 °C'de yaklaşık 3 saat 150 rpm çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakılmış sonra 600 nm'de optik yoğunluk ölçülmüş ve uygun bir değer olan 0,3 olarak bulunmuştur. Bakteri süspansiyonu, buz üzerinde soğutulmuş 50 ml deney tüplerine bölünmüştür. Hücreler 5 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra deney tüpleri 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. LB sıvı besiyeri atıldıktan sonra bakteri peleti buzla soğutulmuş CaCl<sub>2</sub> (100 mM) içerisinde çözündürülerek yeni deney tüpüne aktarılmıştır. Bakteri süspansiyon, 20 ml' ye kadar CaCl<sub>2</sub> (100 mM) ile doldurulmuştur ve gece boyunca 4 °C' de inkübe edilmiştir. Ertesi gün, 3000 g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Deney tüpünün dibine çöken bakteriler 2 ml taze hazırlanmış buzla soğutulmuş CaCl<sub>2</sub> (100 mM) içerisinde çözündürülmüştür.

Hazırlanan kompetent bakteri çözeltilisinden 50 µl yeni eppendorf tüp içerisine alınarak üzerine 1 µl vektör ile birleşmiş Bmal1 karışımı eklenmiştir. Buz üzerinde 30 dk inkübe edildikten sonra 42°C su banyosunda 60 saniye ısı şoku uygulanarak transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında tüp üzerine 200 µl LB sıvı besiyeri ilave edilerek çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra kanamisin antibiyotiği (14100; Pan Biotech) içeren LB agar plakalarına bakteriyel süspansiyonlar eklenmiş ve gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün pozitif olan kolonlardan 2 tanesi seçilerek kanamisin antibiyotiği içeren 5 ml LB sıvı besiyeri içerisine eklenmiş ve plazmitlerin konfirme edilebilmesi için çoğaltılmıştır. Bakteri süspansiyonun kopya sayısının artırılması için gece boyu 37

°C'de inkübe edilmiştir. Kopya sayısı artan bakterilerden ertesi gün plazmit izolasyonu yapılmıştır.

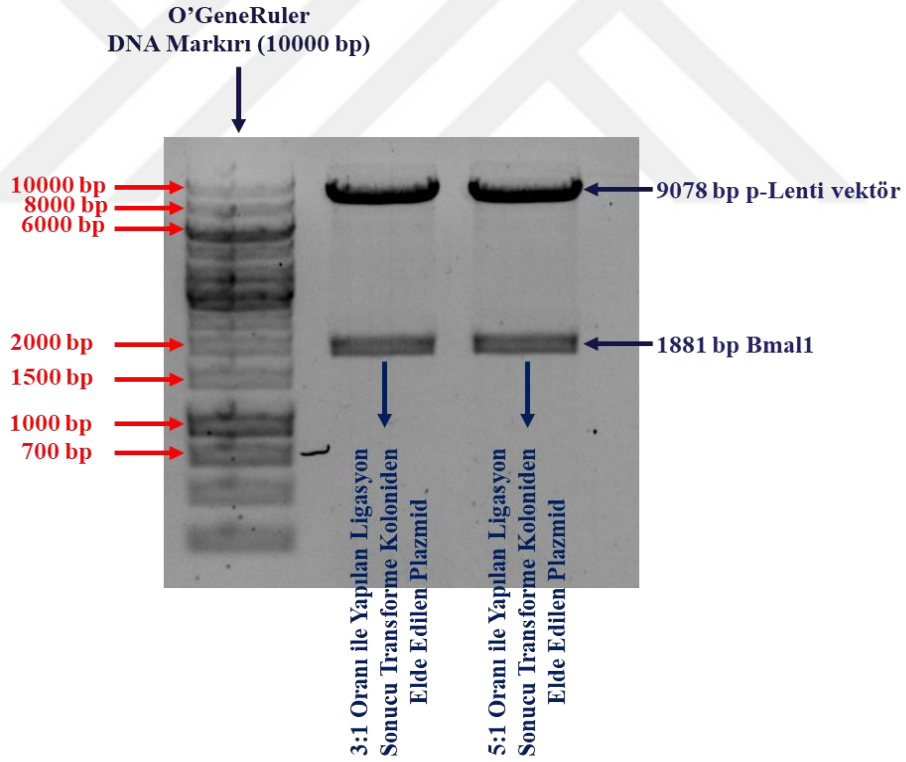
Plazmit izolasyonu için Zymo Plasmid Mini Prep kiti (D4015, Zymo Research) kullanılmıştır. Plazmit izolasyonu için kopya sayısı artmış bakteri süspansiyonu izolasyondan önce 4.000 g 5 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Deney tüpünün üst kısmında bulunan LB sıvı besiyeri atılarak dibeye çöken bakteriler kitin içerisinde bulunan 200 µl P1 solüsyonu ile çözündürülmüştür. Ardından 200 µl P2 solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1-2 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında 400 µl P3 solüsyonu eklenerek 1-2 dk inkübe edilmiş ve nötralizasyon işlemi tamamlanmıştır. 11.000 g'de 2 dk santrifüj edildikten sonra Zymo- Spin™ II-N kolonları bulunan deney tüplerine süpernatantlar transfer edilmiştir. 13.000 g'de 30 s santrifüj edildikten sonra kolonlar üzerine 200 µl Endo- Yıkama solüsyonu eklenerek tekrar 11.000 g'de 30 s santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Ardından 400 µl Plazmit Yıkama solüsyonu eklenmiştir ve 11.000 g'de 60 s santrifüj edilmiştir. Kolonlar yeni 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerine transfer edildikten sonra kolonlar üzerine 30 µl DNA Elüzyon solüsyonu eklenmiştir. 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra son olarak 13.000 g'de 30 s santrifüj işlemi gerçekleştirilerek plazmit izolasyonu yapılmıştır.

p-Lenti vektörü içerisine *Mus musculus Bmal1* transkriptinin klonlamasının kontrolü için Zymo Plasmid Mini Prep plazmit izolasyon kiti ile izole edilen plazmitler *Sall* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. 10X Fast Digestion Solüsyonu (B64, Thermo Scientific) kesim reaksiyonları için kullanılmıştır. Reaksiyon bileşenleri Tablo 5.2.2.9'da gösterilmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımları 37°C'de 45 dk inkübe edildikten sonra enzimlerin aktivasyonunu bloke edilmesi 80°C'de 10 dk inkübasyon sonucunda reaksiyonun durdurulmuştur. Agoroz jelle yüklemeye yapılmadan önce kesim yapılan plazmitler buz üstünde bekletilmiştir. Kesimi yapılan plazmitler 6X yüklemeye boyası kullanılarak %0,8 Agoroz jelle 120 V'ta 20 dk yürütülmüştür. Agoroz jel Biorad Chemidoc görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. 1881 baz çiftine denk gelen Bmal1 DNA bantı ve 9078 baz çiftine denk gelen pLenti-EF-1α-GFP-2A-Puro vektör bantı tespit edilerek plazmit içerisine

yapılan klonlamanın doğruluğu konfirme edilmiştir. Şekil 5.2.2.3'te restriksiyon enzimleri ile kesilen plazmitlerin konfirmasyonu gösterilmiştir.

**Tablo 5.2.2.9.** Restriksiyon reaksiyonu bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim (µl)
Plazmit	5,0
Sall	0,5
BamHI	0,5
10X Fast Digestion Solüsyonu	2,0
ddH <sub>2</sub> O	12,0
<b>Toplam</b>	<b>20,0</b>



**Şekil 5.2.2.3.** Transforme bakteri kolonilerden elde edilen plazmitlerin konfirmasyonu

### 5.2.3. Lentiviral vektörlerin yüksek miktarda üretilmesi, paketlenmesi ve titrasyonun belirlenmesi

Lentivirüs paketleme işleminden önce konfirme edilmiş plazmitin yüksek miktarda çoğaltılması gerekmektedir. Konfirme edilmiş plazmitler ve Bmal1 protein seviyesini azaltan Dharmacon firmasından satın alınan plazmitler transformasyonla tekrar kompetant bakteri içerisine verilerek bakteri kopya sayısı yüksek miktarda arttırılmıştır. ZymoPURE Plasmid Midiprep kiti (D4200, Zymo Research) kullanılarak kitin protokol basamakları takip edilerek gibi yüksek miktarda plazmit izolasyonu yapılmıştır. Plazmit konsantrasyonu NanoPhotometer cihazı (P300, Implen) kullanılarak ölçülmüştür.

Lentivirüslerin paketlenmesi için Lipofectamine 3000 (L3000001, İnvitrogen) kullanılmıştır. Besiyerinde %90-95 doyumluğa ulaşan 293T hücreleri 1,5 ml Tripsin (25200-056, Gibco Thermo Fisher Scientific) kullanılarak besiyerinden kaldırılmıştır. 10 santimetrelik hücre plakalarına her plakada  $4 \times 10^6$  293T hücre olacak şekilde 12 ml Dulbecco's modified medium (Dulbecco's modifiye besiyeri) (DMEM; P04-01158, Pan Biotech) içerisinde ekilmiştir. Ekimi yapılan 293T hücreleri bir gece boyunca 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren Heracell™ 150i hücre inkübatöründe inkübe edilmiştir. Ertesi gün Lipofectamine 3000 ve Opti-MEM hücre kültürü besiyeri (31985062, Thermo Fisher Scientific) kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. A tüpü reaksiyon bileşenleri Tablo 5.2.3.1'de, B tüpü reaksiyon bileşenleri Tablo 5.2.3.2'de gösterilmiştir. A tüpü, B tüpü içerisine eklenerek karıştırılmıştır. Karışım 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 10 cm'lik plakalara 12 ml besiyeri içerisinde ekimi yapılan HEK293T hücreleri inkübatörden çıkartılmıştır. DNA-lipid kompleksi eklenmeden önce plakadan 6 ml besiyeri çekilmiştir. DNA-lipid kompleksi damla damla plakalara eklenmiştir. Plakalar 6 saat boyunca 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren Heracell™ 150i hücre inkübatöründe inkübe edilmiştir. 6 saatin sonunda besiyerinin tamamı plakalardan çekilmiş ve plakalara yeni 12 ml DMEM besiyeri eklenmiştir. Plakalar gece boyunca hücre kültürü inkübatöründe inkübe edilmiştir. 24 saat sonra hücre transfeksiyon besiyeri toplanarak 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Plakalara yeni 12 ml DMEM besiyeri eklenmiştir. Yaklaşık 52 saat sonra tekrar hücre transfeksiyon besiyeri toplanmıştır. Toplanan tüm hücre transfeksiyon besiyerleri

2000 rpm'de 4 °C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından transfeksiyon hücre besiyerleri 0,45 µm low binding filtreden (SLHP033RS, Merck Millipore) geçirilerek hücre artıklarından uzaklaştırılmıştır. Filtreden geçirilen besiyeri ultrasantrifüj tüpleri (344058, Beckman Coulter) içerisine aktarılmıştır. 100.000 g'de 2 saat ultrasantrifüjün sonunda ultrasantrifüj tüpleri dibinde pellet halinde bulunan virüs partikülleri kalsiyum ve magnezyum içermeyen DPBS (P04-3650, Pan Biotech) içerisinde çözdürülmüştür.

**Tablo 5.2.3.1.** A tüpü reaksiyon bileşenleri

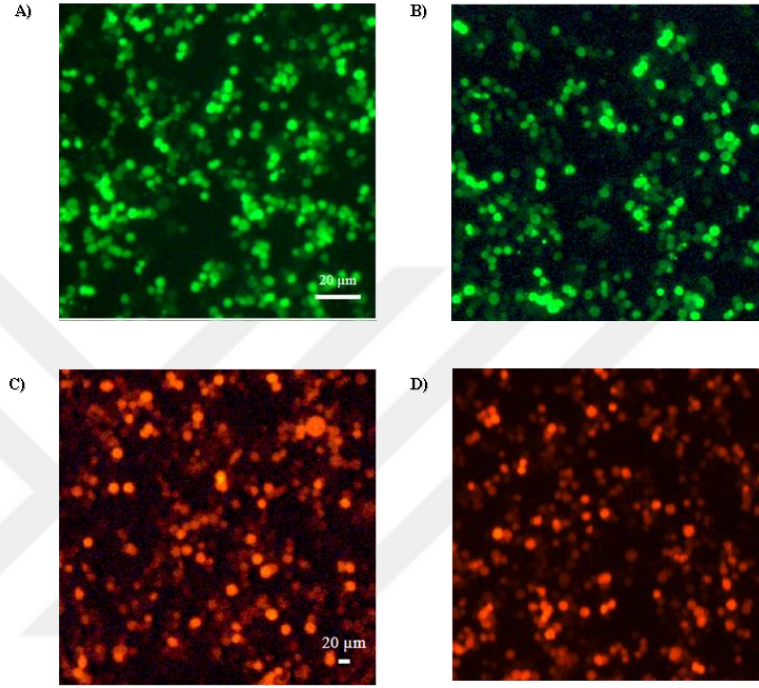
<b>A Tüpü Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>Hacim (µl)</b>
Lipofectamin 3000 (L3000)	41,0 µl
Opti- MEM Besiyeri	1.459,0 µl
<b>Toplam</b>	<b>1,5 µl</b>

**Tablo 5.2.3.2.** B tüpü reaksiyon bileşenleri

<b>B Tüpü Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>Hacim (µl)</b>
pMD2.G plazmit	7,0 µl (0.5 µg/ µl)
psPAX plazmit	7,0 µl (1.0 µg/ µl)
Lv-GFP veya Lv-Bmal1 veya scRNA veya sh-Bmal1 plazmitleri	7,0 µl (1.0 µg/ µl)
P3000 bileşeni	35,0 µl
Opti-MEM Besiyeri	1,444,0 µl
<b>Toplam</b>	<b>1,5 µl</b>

Akış Sitometrisi yöntemi ile yüksek miktarda üretilen virüslerin titrasyonu belirlenmiştir. HCT116 hücrelerinin üzerine DPBS kullanılarak seri dilüsyonla hazırlanan virüs çözeltileri (1:10, 1:100, 1:1000 dilüsyon) eklenmiştir. Virüs eklendikten 24 saat sonra hücre kültürü ortamı taze ortamla değiştirilmiştir, 72 saat

sonra ise hücrelerde titrasyon çalışması yapılmıştır. Akış sitometrisi cihazı (BD Influx Cell sorter Bioprotect IV güvenli kabin, BD Bioscience) kullanılarak GFP ve RFP pozitif hücreler analiz edilmiştir ve virüs titrasyonu hesaplanmıştır. Şekil 5.2.3.1' de lentivirus üretimi sonrası HEK293T hücre petrilerinin konfokal mikroskop görüntüsü verilmiştir.



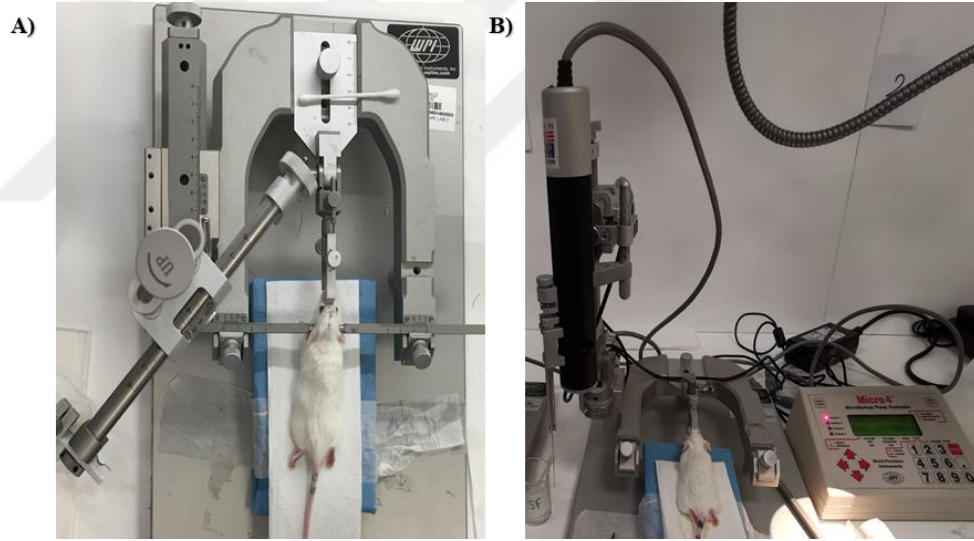
**Şekil 5.2.3.1.** Lentivirüs üretimi yapılırken HEK293T hücre mediumları toplandıktan sonra hücre petrilerin görüntüsü. **A)** HEK293T hücrelerinde Lv-GFP konfokal mikroskop görüntüsü. **B)** HEK293T hücrelerinde Lv-Bmal1 konfokal mikroskop görüntüsü. **C)** HEK293T hücrelerinde scrRNA konfokal mikroskop görüntüsü. **D)** HEK293T hücrelerinde sh-Bmal1 konfokal mikroskop görüntüsü.

### **5.3. Beyin İçi Enjeksiyon Yöntemiyle Virüslerin Verilmesi**

Uygulanan viral transfeksiyonların hedef dokuyu enfekte etmesi yaklaşık olarak 7-10 gün sürmektedir. Bu nedenle akut dönem ve subakut dönem deney seti fareleri, travmatik beyin hasarından 7 gün önce virüs enjeksiyonuna tabi tutulmuştur. Bütün gruplara  $1.6 \times 10^7$  virüs partikülü 2 µl 0.1 M PBS içinde beyin içi enjeksiyon ile korteks seviyesine verilmiştir (121). 8-12 haftalık ve 25-30 gram ağırlığındaki erkek Balb/c fareleri gaz anestezi sistemi ile (%1 İzofluran (N0015A09, Adeka) (%30 O<sub>2</sub>, kalanı



N<sub>2</sub>O) anesteziye alınmıştır. Fareler stereotaktik çerçeveye (50260, World Precision Instruments) yerleştirildikten sonra bregmanın 2,5 mm lateraline ve 2,5 mm arkasına denk gelen nokta tur aleti (H37L1, Marathon vasıtasıyla delinmiştir ve dura yüzeyinin 0,5 mm altındaki korteks bölgesine Lv-GFP, Lv-Bmal1, scrRNA, sh-Bmal1 virüsleri oluşturulan fare gruplarına uygun olacak şekilde Hamilton enjektörü (Hamilton Mikrolitre Şırınga Serisi, Hamilton) ile mikroşırınga pompası kontrol cihazı vasıtasıyla (Microsyring Pump Controller, World Precision Instruments) beyin içi enjeksiyon yöntemi ile verilmiştir (122-124). Kontrol gruplarına ise sadece virüs partiküllerinin çözücüsü olan DPBS verilmiştir. Enjeksiyon hızı dakikada 0,5 µl olacak şekilde uygulanmıştır. Enjeksiyon sonra enjektör 3 dk içerisinde yavaşça çıkartılmıştır (Şekil 5.3.1). Virüs enjeksiyonları sonrasında açılan yara 5,0 ipek dikiş ipliği (S1165, Doğsan) kullanılarak kapatılmıştır. Enjeksiyondan 7 gün sonra hayvanlar travmatik beyin hasarına tabi tutulmuştur.

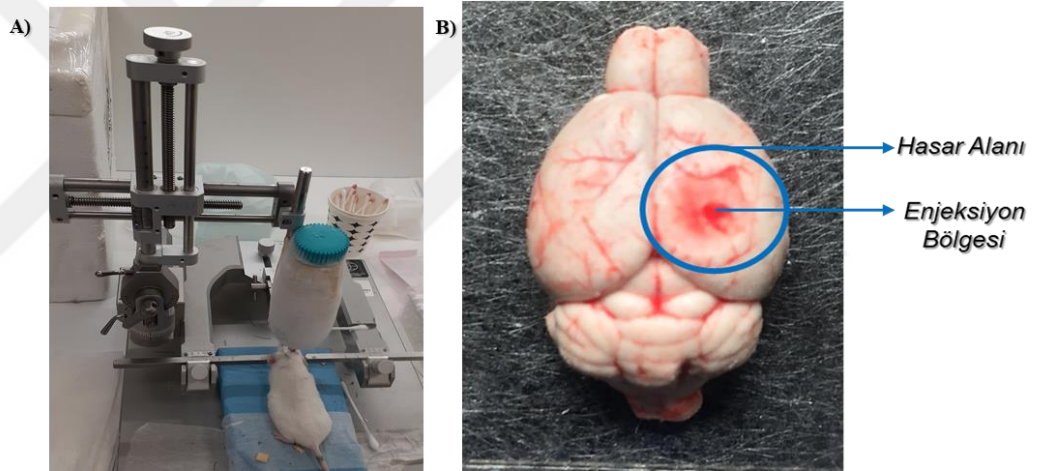


**Şekil 5.3.1.** Beyin içi enjeksiyon yöntemiyle virüslerin verilmesi **A)** Farelerin stereotaktik çerçeveye yerleştirilmesi. **B)** Mikroşırınga pompası kontrol cihazı ve Hamilton enjektörü kullanarak beyin içi virüs enjeksiyonlarının yapılması.

#### **5.4. Travmatik Beyin Hasarının İndüklenmesi**

Beyin hasarı için hayvanlar, soğukla indüklenen travmatik beyin hasarı modeline maruz bırakılmıştır. Bu modelde, klinikte görülen travmatik beyin hasarı deney hayvanında soğukla indüklenerek oluşturulmaktadır. Sıvı perküsyon (fluid

percussion) ve kontrollü kortikal etki deneysel travmatik beyin hasarı modellerine göre bu model hasarın boyutunu ve konumunu iyi bir şekilde sınırlandırabilmekte, kortikal hasarı yüksek oranda yeniden indükleyebilmektedir (125, 126). Hayvanlara %1,5 izofluran (%30 O<sub>2</sub>, kalan N<sub>2</sub>O) ile anestezi uygulanmıştır. Deney boyunca rektal sıcaklık homeotermik örtü ile 36.5-37°C arasında tutulurken, fareler stereotaktik çerçeveye sabitlenmiştir. Nokta tur aleti kullanılarak pariyetal kraniotomi yapılmıştır (2,5 mm bregmanın lateralinde ve bregmanın 2,5 mm arkasında). Travmatik hasar, 60 saniye süreyle doğrudan dura üzerine yerleştirilen ve çıkartılan sıvı nitrojen soğutmalı bakır prob kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.4.1). Daha sonra kafa derisi ipek dikiş ipliği kullanılarak kapatılmıştır (127). Daha sonra hayvanlar, sırasıyla birinci deney seti 24 saat veya ikinci deney seti 35 gün boyunca travma sonrası iyileşme için dinlenme odasında tutulmuştur.



**Şekil 5.4.1.** Travmatik beyin hasarının indüklenmesi **A)** Farelerin soğukla indüklenen travmatik beyin hasarı modeline maruz bırakılması. **B)** Travmatik beyin hasarı sonra oluşan akut dönem hasar alanının gösterilmesi.

### 5.5. Davranış Deneyleri

Davranış deneyleri uygun sıcaklık, ışık ve ses yalıtımı yapılmış İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezi'nde (MEDİTAM bulunan özel davranış odalarında gerçekleştirilmiştir. Fareler davranış testlerine alınmadan önce yaklaşık 30 dk öncesinde davranış testlerinin yapıldığı odaya alıştırmıştır. Davranış testleri travmatik beyin hasarından 3 gün önce, hasardan sonra da 3., 14., 28., 35. günlerde yapılmıştır.

### **5.5.1. Rotarod motor koordinasyon davranış testi**

Motor koordinasyonun belirlenmesinde rotarod test kullanılmıştır. Rotarod cihazında (Ugo Basile) ortada giderek hızlanan (4'den 40 rpm'e 245 saniyede) bir mil bulunmaktadır. Hızlanan mil üzerine bırakılan farelerin bu mil üzerindeki durma süreleri hesaplanmıştır. Bir fare en fazla beş dakika süresince bu cihaz üzerinde durmuştur. Test beş kez tekrarlanmıştır. Beş tekrar sonunda ortalama bir değer elde edilmiştir (129). Elde edilen bu ortalama değerler travmatik beyin hasarı öncesinde elde edilen ortalama değerler ile kıyaslanmıştır.

### **5.5.2. Kuyruktan asma davranış testi**

Depresyon davranışlarının değerlendirilmesinde kuyruktan asma testi kullanılmıştır. Test süresi toplam 5 dakikadır. Test için yerden 50 cm yükseklikte bulunan bir demir aparat kullanılmıştır. Fareler kuyruklarının üçte birlik bölümünden bu aparata asılmıştır. Bu aparatta hareketli kaldıkları zaman ve hareketsiz kaldıkları zaman belirlenmiştir. Elde edilen değerler travmatik beyin hasarı öncesinde elde edilen değerlere göre değerlendirilmiştir (123).

### **5.5.3. Açık alan testi**

Lokomotor aktivite ve anksiyete ile ilgili birçok verinin elde edilebileceği önemli bir testtir. 150 cm çapında ve 35 cm yüksekliğinde olan bir ucu kapatılmış silindir şeklinde olan davranış ünitesi açık alan testi için kullanılmıştır. Silindir tepeden bir kamera yardımıyla izlenmiştir. Her bir fare açık alan testinde 10 dakika süresince kalmış ve operasyon öncesinde ve sonrasında alınan değerler kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

## **5.6. Kroyostat Cihazı ile Beyin Kesimi**

Beyin içi enjeksiyonla virüs verilip travmatik beyin hasarına maruz bırakılan farelerin beyinlerinden kroyostat cihazı (CM1950, Leica) kullanılarak 18 µm kalınlığında koronal kesitler pozitif yüklü camlar (Objektträger; Isotherm) üzerine alınmıştır. Alınan doku kesitleri 30 dakika süresince 40 °C'ye ayarlanmış olan ısıtıcı tabla Wise Term, Wisd Laboratory Instruments) üzerinde fikse edilmiştir. Fiksasyon

sonunda pozitif yüklü camlar immün boyamalar yapıncaya kadar -80°C dolaplarda saklanmıştır.

## **5.7. İmmün Boyamalar**

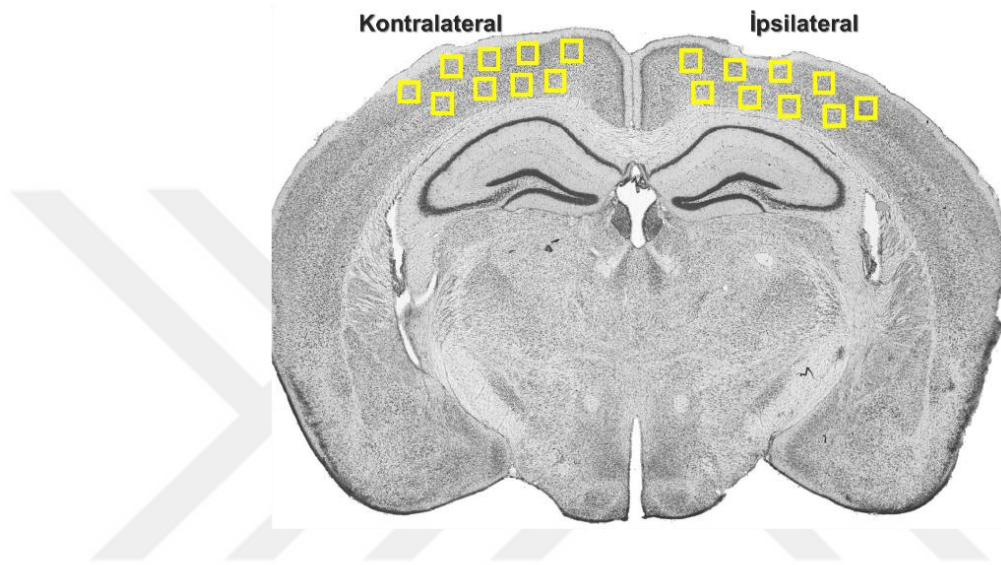
### **5.7.1. Beyin ödemi ve hasar hacminin analizi**

Beyin hasar hacmi ve ödem analizi için akut dönem koronal kesitlere cresyl violet (C5042, Sigma Aldrich) boyaması yapılmıştır. Cresyl violet boyaması sayesinde nöronların nissyl cisimcikleri boyanarak hasarın indüklenmesinden sonra hayatta kalan hücreler boyanmış ve hasar alanı tespit edilmiştir. Boyama işlemi için ilk olarak 37°C'de 30 dk kesitler kurutulmuştur. Örnek kesitleri %4 PFA ile 7 dk oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Kesitler fiksasyondan sonra PBS ile 5 dakika yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından kesitler çalkalayıcı üzerinde 15 dakika hazırlanan cresyl violet solüsyonu içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun hemen ardından kesitler dH<sub>2</sub>O ile yıkandıktan sonra %70, %90, %95 ve %100 etanol (24102, Sigma Aldrich) içerisinde 10 saniye bekletilmiştir. Etanol serilerinin ardından kesitler 3 dakika boyunca ksilen (108684, Merck) solüsyonuna alınmıştır. Son olarak kesitler entellan (M1289, Sigma-Aldrich) kullanılarak lamel ile kapatılmıştır. Boyama sonrasında beyin örnekleri Image J programı (National Institute of Health) kullanılarak ipsilateral ve kontralateral hemisferlerin alanları, hasarın hacmi (mm<sup>3</sup>) ve beyin ödemi (mm<sup>3</sup>) hesaplanmıştır (4).

### **5.7.2. Nöronal sağkalım analizi**

Nöronal sağkalımın belirlenebilmesi için kroyostat cihazı ile alınan 18 µm kalınlığındaki koronal kesitlere NeuN immüno Floresan boyaması yapılmıştır. Her gruptaki hayvanlardan alınan ve -80°C'de muhafaza edilen kesitler -80°C'den çıkartılıp 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur. İlk aşamada örnek kesitleri %4 PFA ile 15 dk oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra PFA artıklarından uzaklaşmak için 0,1M PBS ile üç kez 5'er dakika yıkanmıştır. 0,1M PBS içerisine, %0,3 Triton-X100 ve %10 normal keçi serumu eklenerek bloklama solüsyonu hazırlanmıştır. Beyinler 1 saat süresince oda sıcaklığında bloklama solüsyonu ile inkübe edildikten sonra tekrar 0,1M PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Sonra bir gece süresince konjuge NeuN antikoru (1:200 dilüsyon) ile inkübe edilmiştir.

DAPI (D9542, Sigma Aldrich,) ile çekirdek boyaması yapılarak floresan ışımının solmasını engelleyici kapatma sıvısı (F4680, Sigma Aldrich,) kullanılarak lamel ile kesitler kapatılmıştır. Korteksten bölgesinden rastgele seçilen  $62.500 \mu\text{m}^2$ ' lik dokuz farklı bölgelerden çekirdek boyaması ile üst üste denk gelen NeuN pozitif hücre sayımı yapılmıştır (128) (Şekil 5.7.2.1).

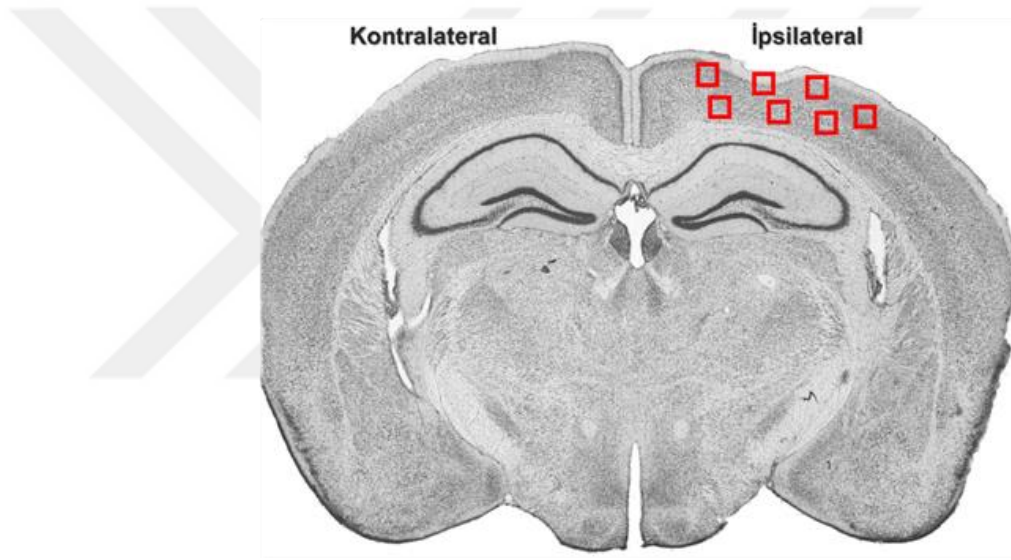


**Şekil 5.7.2.1.** Nöronalsağkalım sayım şeması

### 5.7.3. Apoptotik hücre tayini

Apoptozun gösterilmesi için  $18 \mu\text{m}$  kalınlığındaki koronal kesitlere DNA kırıklarının *in situ* olarak tanımlayan TUNEL (terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP nick uç etiketlemesi) boyaması yapılmıştır. Her bir gruptaki hayvanlardan alınan kesitler  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkartılıp 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurutulmuş ve PBS içerisinde hazırlanan % 4 PFA (158127, Sigma-Aldrich) ile 10 dk boyunca kesitler fiksasyon işlemine tabi tutulmuştur. Fiksasyon işleminin ardından PFA artıklarının uzaklaşması için PBS yıkamasının yapılmıştır. Ardından kesitler, Triton-X-100 (X100, Sigma Aldrich) deterjanı ve trisodyumsitratdihidrat (1.064.481.000, Merck,) içeren solüsyona alınmış ve kaynatılarak membran por geçirgenliği ve antijen geri kazanımı artırılmıştır. Sonrasında 5 dk PBS yıkaması yapılarak oda sıcaklığında normal keçi serumu (NGS, G9023, Sigma Aldrich,) içeren PBS-Triton X solüsyonu ile 1 saat bloklama işlemine tabi tutulmuştur. TUNEL kiti

içinde bulunan enzim ve substrat karıştırılarak (1:11 oranında) elde edilen karışım örnekler üzerine eklenip 37°C'de 70 dk boyunca reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Reaksiyon PBS ile sonlandırılmıştır. Hücrelerin çekirdekleri 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (D9542, Sigma Aldrich) ile işaretlendikten sonra örnekler floresan ışımının solmasını engelleyici kapatma sıvısı (F4680, Sigma Aldrich) kullanılarak lamel ile kapatılmıştır. Örnekler konfokal mikroskobu (LSM 780, Zeiss) kullanılarak görüntülenmiştir. İpsilateral korteks seviyesinden belirlenen 62.500  $\mu\text{m}^2$ 'lik rastgele yedi farklı alandan TUNEL ve DAPI pozitif hücreler sayılmıştır. Korteks bölgesinden belirlenen alanlardaki hücreler sayılarak grupların ortalaması alınarak analiz edilmiştir (127) (Şekil 5.7.3.1).



**Şekil 5.7.3.1.** Apoptotik hücre sayım şeması

## 5.8. Protein Çalışmaları

### 5.8.1. Protein izolasyonu

İpsilateral (hasarlı) korteks bölgesinden alınan doku örneklerinden protein izolasyonu yapılmıştır. Aynı gruba ait doku örnekleri bir araya getirilip protein izolasyonu yapılmıştır. Dokular, proteaz ve fosfotaz inhibitör kokteyl karışımı (5782, Cell Signaling) ilave edilmiş lizis solüsyonu (1M Tris-HCl, 5M NaCl, Triton-X-100, 0,5M EDTA) içerisinde manyetik boncuklar yardımıyla homojenizatör cihazında (BeadBug™ microtube homogenizer, Benchmark Scientific) (Resim 5.8.1.1) homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun ardından doku örnekleri 15 dk buz üstünde

bekletilmiştir. Sonra 4°C’de 15 dakika 13.000 rpm’de santrifüj işlemi yapılarak proteinlerin doku artıklarından ayrışması sağlanmıştır.



**Resim 5.8.1.1.** Protein homojenizatör cihazı (BeadBug™ microtube homogenizer, Benchmark Scientific)

### 5.8.2. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Dokular iyice homojenize edildikten sonra Qubit protein konsantrasyon analiz kiti (Q33211, Invitrogen) kullanılarak Qubit 3.0 Fluorometer cihazı (Q33216, Invitrogen) (Resim 5.8.2.1) ile protein karışımlarının konsantrasyonları ölçülmüştür. Analiz kiti içerisinde mevcut olan Qubit protein reaktifi (Komponent A) ve Qubit solüsyonu (Komponent B) karıştırılarak Qubit protein solüsyonu elde edilmiştir. Qubit 3.0 Fluorometer cihazının kalibrasyonu için Qubit analiz kiti içerisinde mevcut olan 3 farklı konsantrasyonu bilenen kalibrasyon standartları kullanılmıştır. Toplam protein miktarı  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  olarak hesaplanmıştır.



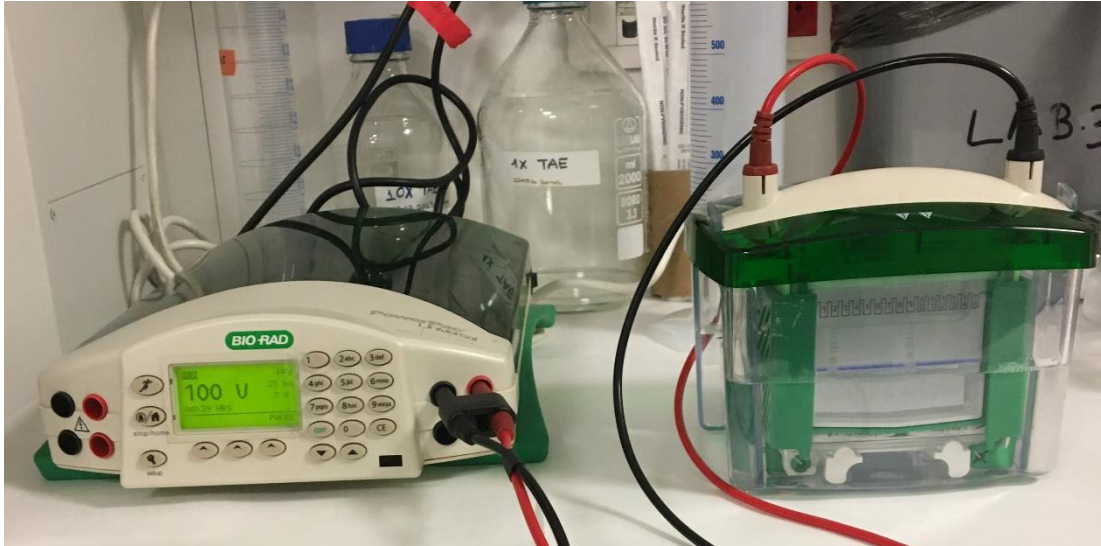
### Resim 5.8.2.1. Qubit 3.0 Fluorometer cihazı

### 5.8.3. Western blot

Konsantrasyon ölçümü sonrasında protein örnekleri Western blot için hazırlanmıştır. Herbir Protein örneği için 20 µg konsantrasyonunda protein karışımı, 10 µl 2X Laemmli tampon solüsyonu (161-0747, Biorad) ve geri kalanı ddH<sub>2</sub>O olacak şekilde 10 µl hacimde hazırlanmıştır. Proteinler birincil yapılarına dönüştürülmek için 5 dk 95 °C'de inkübe edildikten sonra buz üzerine alınmıştır. Eşit miktar ve hacimde hazırlanan protein karışımları Mini-Protean TGX Precast protein jeli (4569033, Biorad) içerisine yüklenmiştir. Dikey jel elektroforez sistemi (Mini-Protean® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad) (Resim 5.8.3.1) kullanılarak 100 V'de yaklaşık 2 saat kadar yürütülen proteinler elektroforezle moleküler ağırlıklarına göre ayırılmıştır. Elektroforez işleminin ardından proteinlerin jelden membrana transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Bio-Rad Transblot Turbo sistemi (1704150 Trans-Blot® Turbo™ Transfer System Bio-Rad) (Resim 5.8.3.2) ve RTA Mini PVDF Transfer Kiti kullanılarak (170-4272; Bio-Rad) yarı kuru blotlama yöntemi ile jeller Polivinilidinden Florür (PVDF) membranlara transfer edilmiştir. Membranlar 50 mM TBS-T (%0,1 Tween-20 (P1379, Sigma Aldrich) içeren tamponlanmış Tris salin (T1503, Sigma Aldrich) ile hazırlanan %5'lik yağsız süt tozunda (sc-2325, Blotto, Ultracruz) 1 saat çalkalayıcı üzerinde bloklanmıştır. Bloklamadan sonra PDVF membranlar TBS-T ile 5 dk yıkanmıştır. Bloklama sonrası membranlar TBS-T içerisinde hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu çözeltisinde çözeltisinde Bmal1 (14020, Cell Signalling, 1:1000 dilüsyon), p-Akt (Thr 308) (9275, Cell Signalling, 1:1000 dilüsyon), p-Erk (9101, Cell Signalling, 1:1000 dilüsyon), p-SAPK/JNK (9255, Cell Signaling, 1:1000 dilüsyon), Bcl-XL (2764, Cell Signalling, 1:1000 dilüsyon), Bax (2772, Cell Signalling, 1:1000 dilüsyon), eNOS (sc-376751, Santa Cruz, 1:500 dilüsyon), Gap43 (5303, Cell Signalling, 1:1000 dilüsyon), Brevican (610895, BD Bioscience, 1:500 dilüsyon), Versican (ab19345, Abcam, 1:500 dilüsyon) birincil antikorları ile bir gece boyunca muamele edilmiştir. Ertesi gün TBS-T yıkaması yapılarak membranlar primer antikor kalıntılarından uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminin ardından TBS-T içerisinde hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu çözeltisinde yabancı turbu peroksidaz (HRP) konjuge tavşan antijenine karşı keçi de üretilmiş sekonder antikor (31460, Thermo Scientific,



1:5000 dilüsyon) ve HRP konjuge fare antijenine karşı keçide üretilmiş sekonder antikor (R-05071-500, Advansta, 1:5000 dilüsyon) membranların üzerine eklenmiş ve 90 dakika oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda membranlar tekrar 3 kez 5'er dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra 5 dakika ECL Western Görüntüleme Solüsyonuna (1705060, Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad) tabi tutularak kemilüminesans olarak Chemidoc MP görüntüleme sisteminde (1708280, Biorad) görüntülenmiştir. Görüntüleme işlemi biten membranlara Restore™ Western Blot Stripping Buffer (21059, Thermo Scientific) solüsyonu yardımıyla stripleme yapılmıştır. Stripleme sayesinde membranlara bağlanan birincil ve ikincil antikorlar sökülmüştür. Stripleme işleminin ardından membranlar TBS-T ile beş kez beş dakika boyunca yıkanmış ardından yeniden oda sıcaklığında bir saat süresince %5 yağsız süt tozu ile bloklama işlemi uygulanmıştır. Sonrasında, membranlar 2 saat süresince oda sıcaklığında monoklonal  $\beta$ -Aktin (4970, Cell Signaling, 1:1000 dilüsyon) antikoruna ile inkübe edilmiştir. Western Blot sonunda elde edilen membran görüntüleri bilgisayar programı (Image J; National Institute of Health) yardımıyla yoğunluk farkına göre ve  $\beta$ -Aktin protein seviyesine oranlanarak analiz edilmiştir. Her protein için en az üç tekrar olacak şekilde Western Blot yapılmıştır (18).



**Resim 5.8.3.1.** Dikey jel elektroforez sistemi (Mini-Protean® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad)



**Resim 5.8.3.2.** Yarı kuru (Semi-dry) transfer sistemi. (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System Bio-Rad)

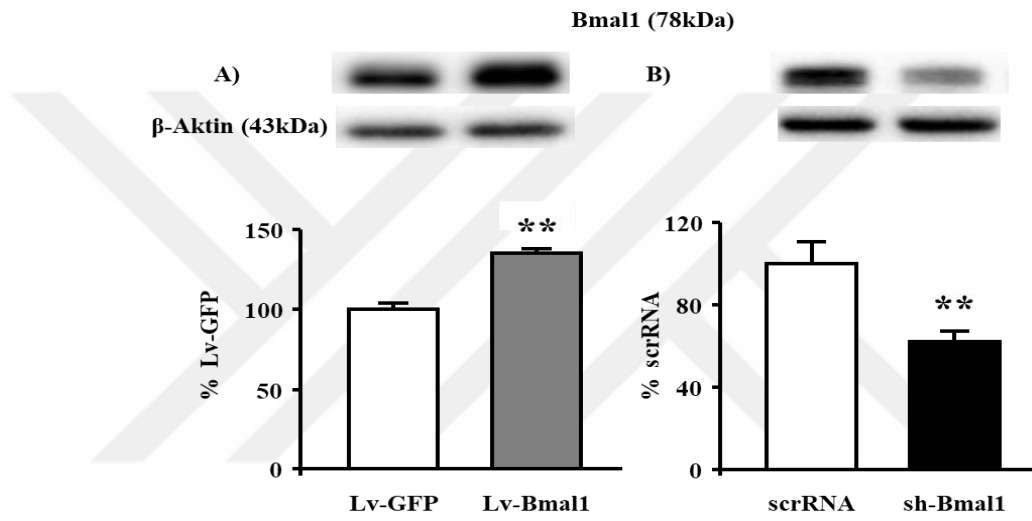
### **5.9. İstatistiksel Analizler**

Lv-GFP, Lv-Bmal1, scrRNA, sh-Bmal1, kontrol grupları arasındaki farklılıkların istatistiksel analizler SPSS programı (IBM) kullanılarak belirlenmiştir. Grupların kendi içlerindeki istatistiksel analizler bağımsız örneklem t testi (independent samples t test) kullanılarak hesaplanmıştır. Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir, \* $p < 0,05$  ve \*\* $p < 0,01$  istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir. Davranış deneyleri değerleri ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Beyin içi enjeksiyonla kortekse verilen Bmal1 lentivirüslerin Bmal1 ifadesini arttırması ve azaltması

Beyin içi enjeksiyonla kortekse verilen Lv-GFP, Lv-Bmal1, scrRNA, sh-Bmal1 lentivirüslerinden Lv-Bmal1 lentivirüsünün Bmal1 ifadesini arttırması ve sh-Bmal1 lentivirüsünün Bmal1 ifadesini azaltması Western blot yöntemi ile protein düzeyinde gösterilmiştir.



**Şekil 6.1.1.** Beyin içi enjeksiyonla kortekse verilen Bmal1 lentivirüs ifadelerinin Western blot yöntemi ile protein düzeyinde gösterilmesi. **A)** Lentivirüsler aracılığıyla Bmal1 ifadesinin korteks bölgesinde arttırılması. **B)** Lentivirüsler aracılığıyla Bmal1 ifadesinin korteks bölgesinde azaltılması. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*\* $p < 0,01$  GFP grubuna ve scrRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

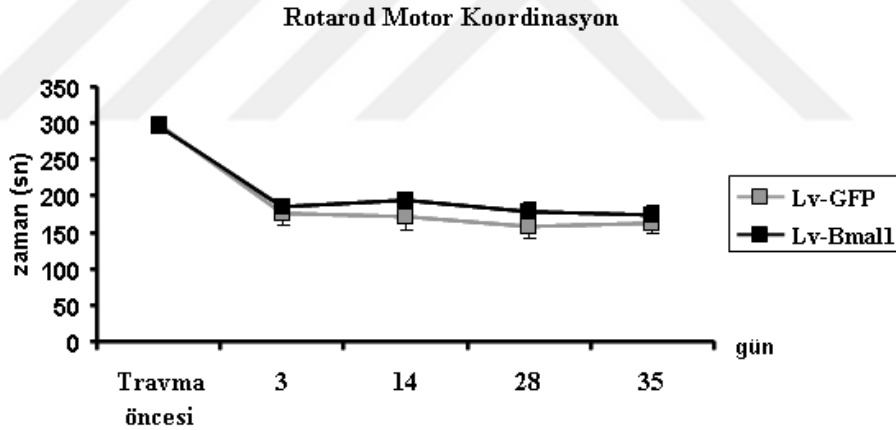
Beyin içi enjeksiyonla kortekse verilen Bmal1 lentivirüsleri Bmal1 protein seviyesini Lv-GFP gruba göre Lv-Bmal1 grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede ( $p < 0,01$ ) arttırırken; scrRNA grubuna göre sh-Bmal1 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ( $p < 0,01$ ) azaltmıştır.

## 6.2 Davranış Deneyleri

Davranış deneyleri İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi bünyesinde bulunan davranış laboratuvarlarında uygun sıcaklık, nem, ışık ve çevre şartları altında yapılmıştır. Fareler davranış testlerine alınmadan önce yaklaşık 30 dk öncesinde davranış testlerinin yapıldığı odaya alıştırmıştır. Davranış testleri travmatik beyin hasarından 3 gün önce, hasardan sonra da 3., 14., 28., 35. günlerde yapılmıştır.

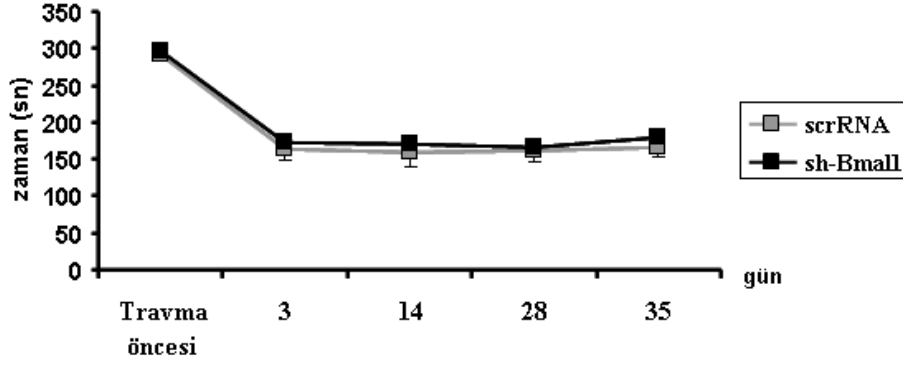
### 6.2.1 Rotarod motor koordinasyon testi

Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası motor koordinasyona etkisinin belirlenmesinde Rotarod testi kullanılmıştır. Farelere bu test; travma öncesi, 3., 14., 28. ve 35. günlerde uygulanmıştır. Belirtilen günlerde her bir fare toplam beş kere bu teste girmiş olup ilgili gün alınan beş verinin ortalaması alınmıştır. Elde edilen veriler neticesinde aşağıda belirtilen grafikler hazırlanmıştır.



**Şekil 6.2.1.1** Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası motor koordinasyon üzerine olan etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Trava öncesi: Operasyon öncesi 3. günü, 3: Operasyon sonrası 3. günü, 14: operasyon sonrası 14. günü, 28: operasyon sonrası 28. günü ve 35: operasyon sonrası 35. günü göstermektedir. Lv-GFP grubu için n=12, Lv-Bmal1 grubu için n=10.

### Rotarod Motor Koordinasyon



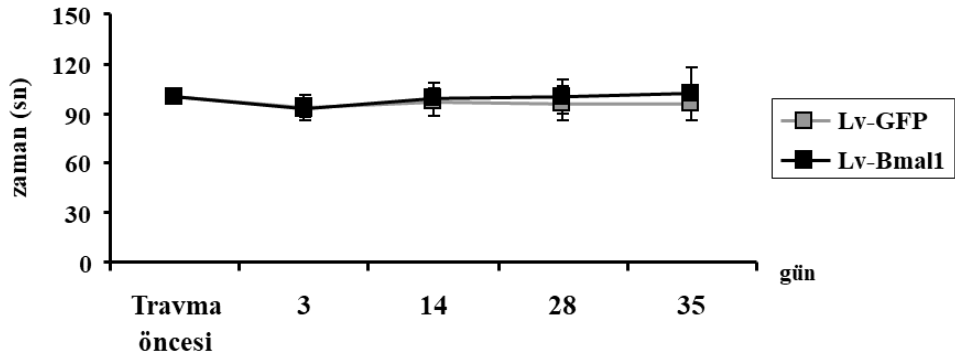
**Şekil 6.2.1.2** Bmall'ın travmatik beyin hasarı sonrası motor koordinasyon üzerine olan etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Travma öncesi: Operasyon öncesi 3. günü, 3: Operasyon sonrası 3. günü, 14: operasyon sonrası 14. günü, 28: operasyon sonrası 28. günü ve 35: operasyon sonrası 35. günü göstermektedir. scrRNA grubu için n=12, sh-Bmall grubu için n=11.

Normal fizyolojik koşullar altında alınan ölçümlerde farelerin yaklaşık olarak 300 s süresince rotarod platformu üzerinde kalabildiği gösterilmiştir. Gruplar kendi kontrolü ile karşılaştırıldığında benzer eğilim izlediği görülmüştür. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark gözlenmemiştir. Travmatik beyin hasarının indüklenmesinden sonra, 3. Günde yapılan testte ise tüm grupların travmaya bağlı olarak motor koordinasyonlarında düşüş gözlemlenmiştir. 3., 14., 28. Gün yapılan rotarod testinde Bmall ifadesi arttırılan Lv-Bmall grubunun ve Bmall ifadesi azaltılan sh-Bmall grubunun motor koordinasyonu kendi kontrol grubuna kıyasla biraz daha iyi olduğu gözlemlenmesine rağmen iki grup arasında yapılan istatistiksel analizde bir farklılık görülmemiştir (Şekil 6.2.1.1 ve Şekil 6.2.1.2).

### 6.2.2 Kuyruktan asma davranış testi

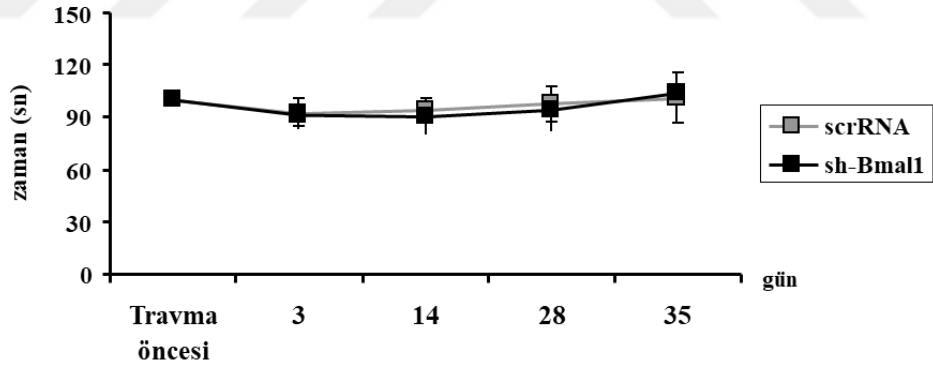
Bmall'e bağlı olarak travmatik beyin hasarı sonrası depresyonun belirlenmesinde kuyruktan asma davranış testi kullanılmıştır. Bu testte fareler kuyruklarının yaklaşık üçte birlik bölümünden yerden 50 cm yükseklikte bulunan demir bir çubuğa asılmışlardır. Beş dakikalık test süresi boyunca farelerin hareketsiz kaldığı süreler değerlendirilmiştir.

### Kuyruktan asma testi (hareketsizlik süresi)



**Şekil 6.2.2.1.** Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası depresyon üzerine olan etkisinin kuyruktan asma testi aracılığıyla değerlendirilmesi. Veriler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Travma öncesi: Operasyon öncesi 3. günü, 3: Operasyon sonrası 3. günü, 14: operasyon sonrası 14. günü, 28: operasyon sonrası 28. günü ve 35: operasyon sonrası 35. günü göstermektedir. Lv-GFP grubu için n=12, Lv-Bmal1 grubu için n=10.

### Kuyruktan asma testi (hareketsizlik süresi)

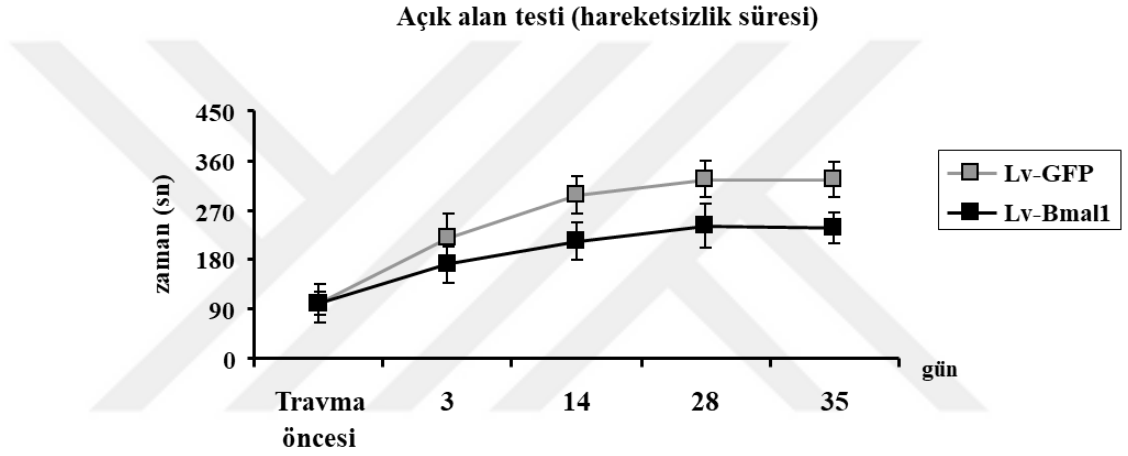


**Şekil 6.2.2.2.** Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası depresyon üzerine olan etkisinin kuyruktan asma testi aracılığıyla değerlendirilmesi. Veriler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Travma öncesi: Operasyon öncesi 3. günü, 3: Operasyon sonrası 3. günü, 14: operasyon sonrası 14. günü, 28: operasyon sonrası 28. günü ve 35: operasyon sonrası 35. günü göstermektedir. scrRNA grubu için n=12, sh-Bmal1 grubu için n=11.

Travmatik beyin hasarının indüklenmesinden sonra farelerin hareketli oldukları süre travma öncesine göre azalmış olup daha fazla hareketsiz kalmışlardır. Gruplar karşılaştırıldığında benzer eğilim izlediği görülmüştür. Gruplar kendi arasında kıyaslandığında istatistiksel anlamlı fark gözlenlenmemiştir (Şekil 6.2.2.1 ve Şekil 6.2.2.2).

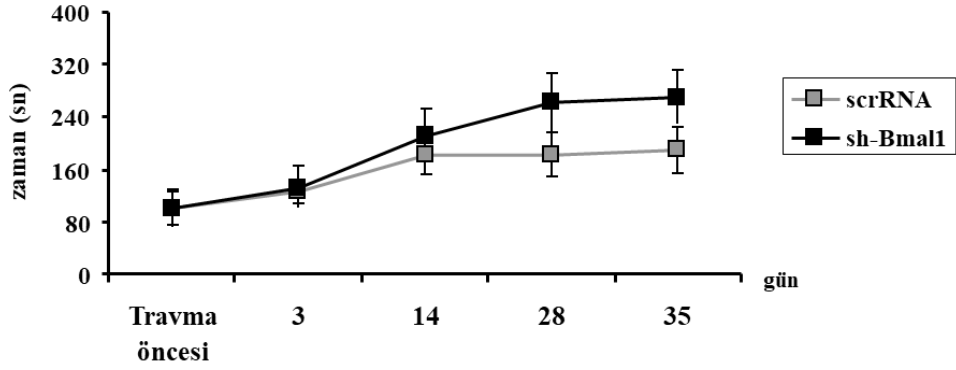
### 6.2.3 Açık alan testi

Bmal1'e bağlı olarak travmatik beyin hasarı sonrası lokomotor aktivitenin belirlenmesinde açık alan davranış testi kullanılmıştır.



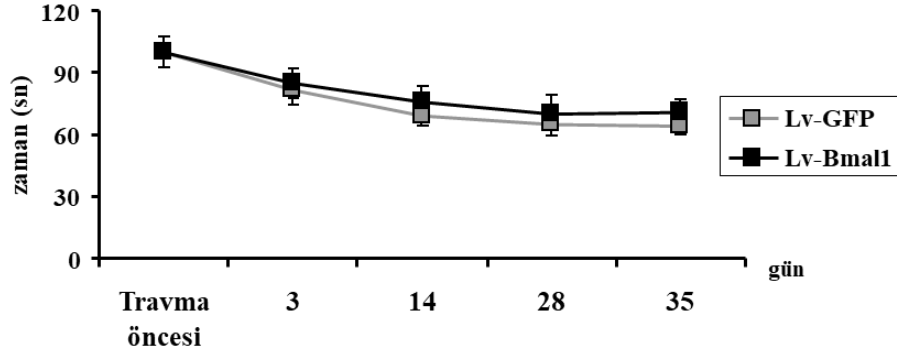
**Şekil 6.2.3.1.** Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası lokomotor aktivite üzerine olan etkisinin açık alan testi aracılığıyla hareketsizlik süresinin değerlendirilmesi. Veriler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Travma öncesi: Operasyon öncesi 3. günü, 3: Operasyon sonrası 3. günü, 14: operasyon sonrası 14. günü, 28: operasyon sonrası 28. günü ve 35: operasyon sonrası 35. günü göstermektedir. Lv-GFP grubu için n=12, Lv-Bmal1 grubu için n=10.

### Açık alan testi (hareketsizlik süresi)



**Şekil 6.2.3.2.** Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası lokomotor aktivite üzerine olan etkisinin açık alan testi ile hareketsizlik süresinin değerlendirilmesi. Veriler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Travma öncesi: Operasyon öncesi 3. günü, 3: Operasyon sonrası 3. günü, 14: operasyon sonrası 14. günü, 28: operasyon sonrası 28. günü ve 35: operasyon sonrası 35. günü göstermektedir. scrRNA grubu için n=12, sh-Bmal1 grubu için n=11.

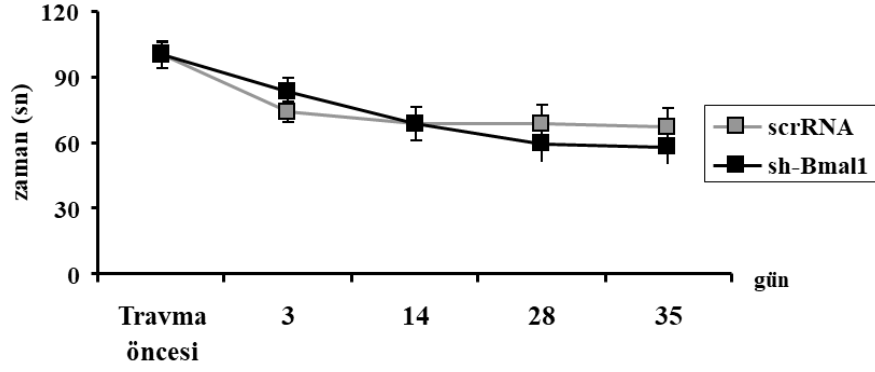
### Açık alan testi (hareketlilik süresi)



**Şekil 6.2.3.3.** Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası lokomotor aktivite üzerine olan etkisinin açık alan testi aracılığıyla hareketlilik süresinin değerlendirilmesi. Veriler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Travma öncesi: Operasyon öncesi 3. günü, 3: Operasyon sonrası 3. günü, 14: operasyon sonrası 14. günü, 28: operasyon sonrası 28. günü ve 35: operasyon sonrası 35. günü göstermektedir. Lv-GFP grubu için n=12, Lv-Bmal1 grubu için n=10.



### Açık alan testi (hareketlilik süresi)



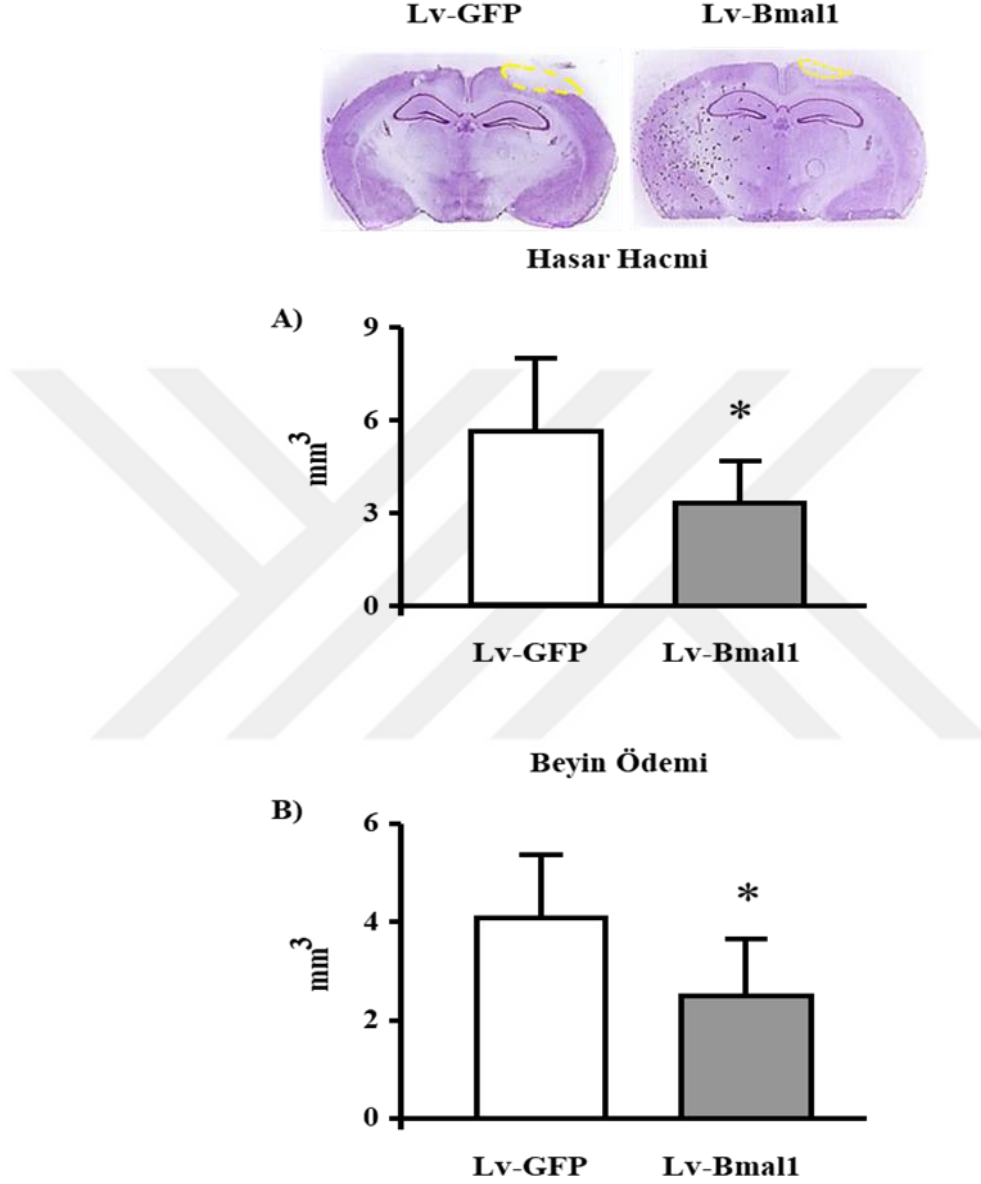
**Şekil 6.2.3.4.** Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası lokomotor aktivite üzerine olan etkisinin açık alan testi ile hareketlilik süresinin değerlendirilmesi. Veriler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Travma öncesi: Operasyon öncesi 3. günü, 3: Operasyon sonrası 3. günü, 14: operasyon sonrası 14. günü, 28: operasyon sonrası 28. günü ve 35: operasyon sonrası 35. günü göstermektedir. scrRNA grubu için n=12, sh-Bmal1 grubu için n=11.

Travmatik beyin hasarının indüklenmesinden sonra farelerin hareketsiz kaldıkları süre travma öncesine göre artmıştır. 35. günde Lv-Bmal1 grubu farelerinin Lv-GFP grubuna göre hareketsiz kaldıkları süre azalırken (Şekil 6.2.3.1); sh-Bmal1 grubu farelerinin scrRNA grubu fareleri ile karşılaştırıldığında hareketsiz kaldıkları süre artmıştır (Şekil 6.2.3.2). 35. günde Lv-Bmal1 grubu farelerinin Lv-GFP grubuna göre hareketli kaldıkları süre artarken (Şekil 6.2.3.3); sh-Bmal1 grubu farelerinin scrRNA grubu fareleri ile karşılaştırıldığında hareketli kaldıkları süre azalmıştır (Şekil 6.2.3.4). Gruplar kendi kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında gruplar arasında benzer eğilim olduğu olduğu ve gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark olmadığı gözlemlenmiştir.

### 6.3. Beyin Ödemi ve Hasar Hacminin Analizi

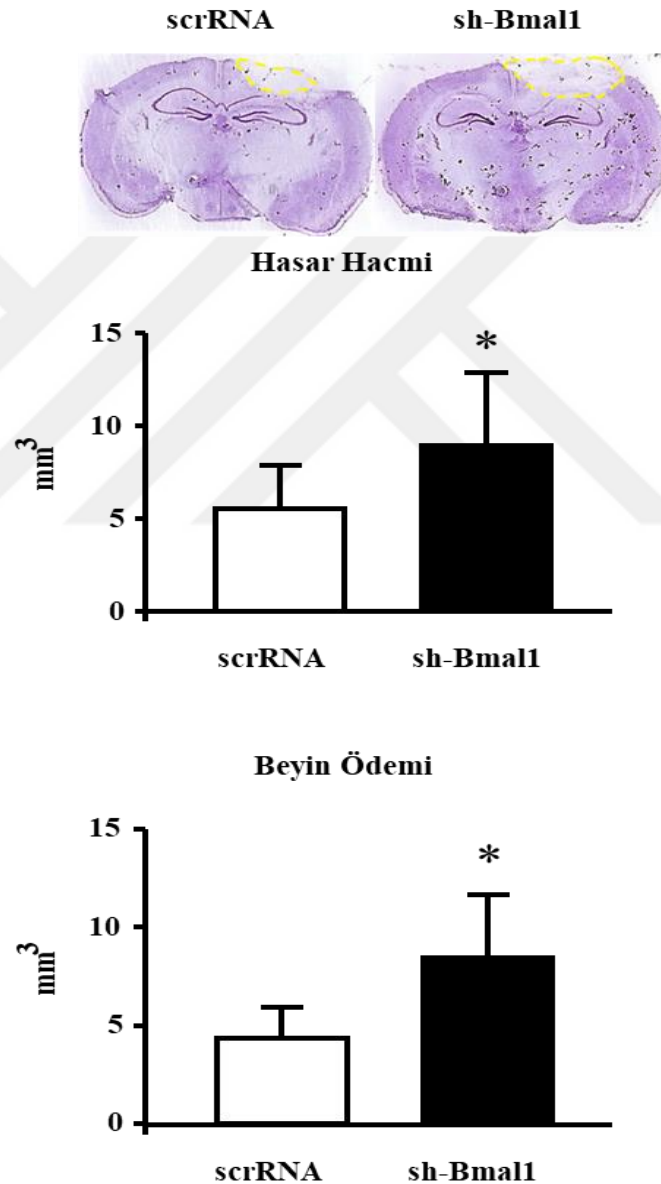
Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası etkilerinin incelenmesi için proje kapsamında akut deney seti olarak tanımlanan Set-I deney gruplarındaki farelerin beyinlerinden kroyostat cihazı aracılığıyla alınan kesitlere cresyl violet boyaması yapılmıştır. Cresyl violet boyaması sayesinde nöronların nissyl cisimcikleri boyanarak

hasarın indüklenmesinden sonra hayatta kalan hücreler boyanmış ve hasar alanı tespit edilmiştir. Hasar hacmi ve ödem, bilgisayar programı (Image J) yardımıyla korteks hasarlı ve hasarsız hemisfer alanları ölçülerek  $\text{mm}^3$  cinsinden hesaplanmıştır.



**Şekil 6.3.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası akut dönem deney seti farelerden alınan koronal kesitlerden Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubunun hasar hacmi ve beyin ödemi analizi. (A) Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubunun hasar hacmi analizi. (B) Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubunun beyin ödem analizi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0.05$  Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Travmatik beyin hasarı sonrası korteks bölgesinde Lv-GFP ve Lv-Bmal1 grubunda meydana gelen infarkt hacimleri sırasıyla; 5,57 mm<sup>3</sup> ve 3,33 mm<sup>3</sup> olarak hesaplanıp Bmal1 ifadesinin arttırıldığı Lv-Bmal1 grubunda istatistiksel olarak hasar hacmi anlamlı şekilde azalmıştır (p<0,05). Travmatik beyin hasarı sonrası oluşan ödemler sırasıyla; Lv-GFP grubu 4,09 mm<sup>3</sup>, Lv-Bmal1 2,50 mm<sup>3</sup> olarak hesaplanmıştır. Lv-Bmal1 grubunun, Lv-GFP grubu ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlı bir şekilde daha az ödeme sahip olduğu gösterilmiştir (p<0,05) (Şekil 6.3.1).



Şekil 6.3.2. Travmatik beyin hasarı sonrası akut dönem deney seti farelerden alınan koronal kesitlerden Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunun hasar hacmi ve beyin

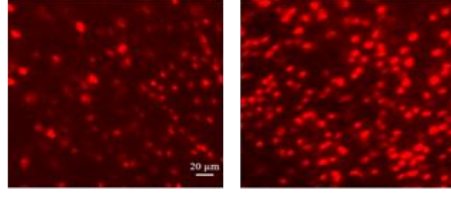
ödemi analizi. (A) Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunun hasar hacmi analizi. (B) Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunun beyin ödem analizi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0.05$  scrRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Travmatik beyin hasarı sonrası korteks bölgesinde meydana gelen hasar hacimleri sırasıyla; scrRNA grubu  $5,57 \text{ mm}^3$ , sh-Bmal1 grubu  $8,96 \text{ mm}^3$  olarak hesaplanmıştır. Bmal1 ifadesinin azaltıldığı sh-Bmal1 grubunda istatistiksel olarak hasar hacmi anlamlı olarak artmıştır ( $p < 0,05$ ). Travmatik beyin hasarı sonrası scrRNA grubunda ve sh-Bmal1 grubunda meydana gelen beyin ödemi sırasıyla  $4,36 \text{ mm}^3$ ,  $8,48 \text{ mm}^3$  olarak analiz edilmiştir. Bmal1 ifadesinin azaltıldığı sh-Bmal1 grubu beyin ödeminde istatistiksel anlamlı bir şekilde artış görülmüştür ( $p < 0,05$ ) (Şekil 6.3.2).

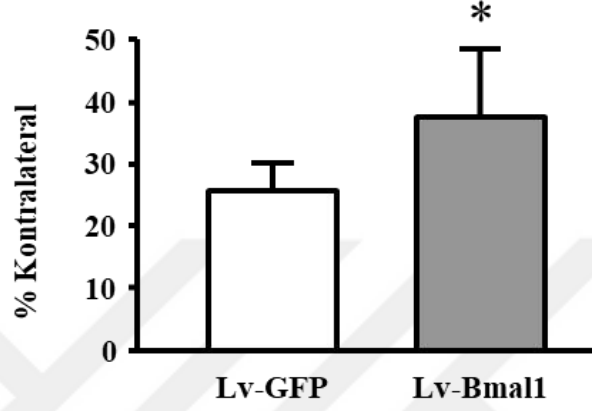
Tüm bu bilgiler dahilinde lentivirüsler aracılığıyla ifadesi arttırılan Bmal1'in hasar hacmi ve beyin ödemi azalttığı, lentivirüsler aracılığıyla ifadesi azaltılan Bmal1'in hasar hacmi ve beyin ödemi arttırdığı görülmektedir.

#### **6.4. Nöronal sağkalım Analizi**

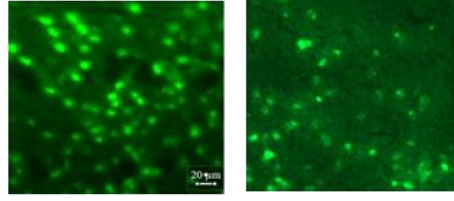
Nöronal sağkalımın belirlenebilmesi için akut dönem deney seti fare beyinlerinden alınan koronal kesitlere NeuN immün boyaması yapılmıştır. Boyama sonrasında ipsilateral ve kontralateral korteks bölgesinden belirlenen  $62.500 \mu\text{m}^2$ 'lik dokuz farklı alandan NeuN pozitif hücreler sayılmıştır ve kontralateral hemisfere oranlanarak verilmiştir.



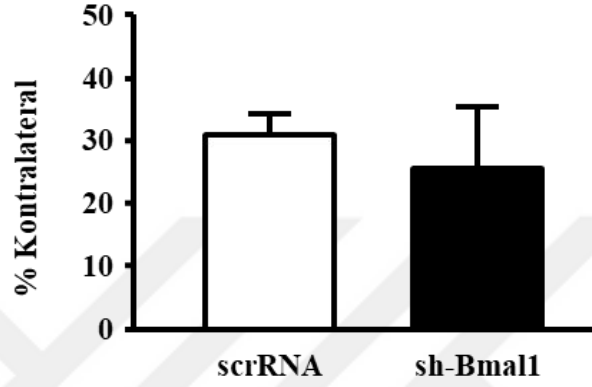
### Nöronal sağkalım



**Şekil 6.4.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası akut dönem deney seti farelerden alınan koronal kesitlerden Bmal1 ifadesinin artırıldığı deney grubunun nöronal sağkalım analizi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0.05$  Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.



### Nöronal sağkalım



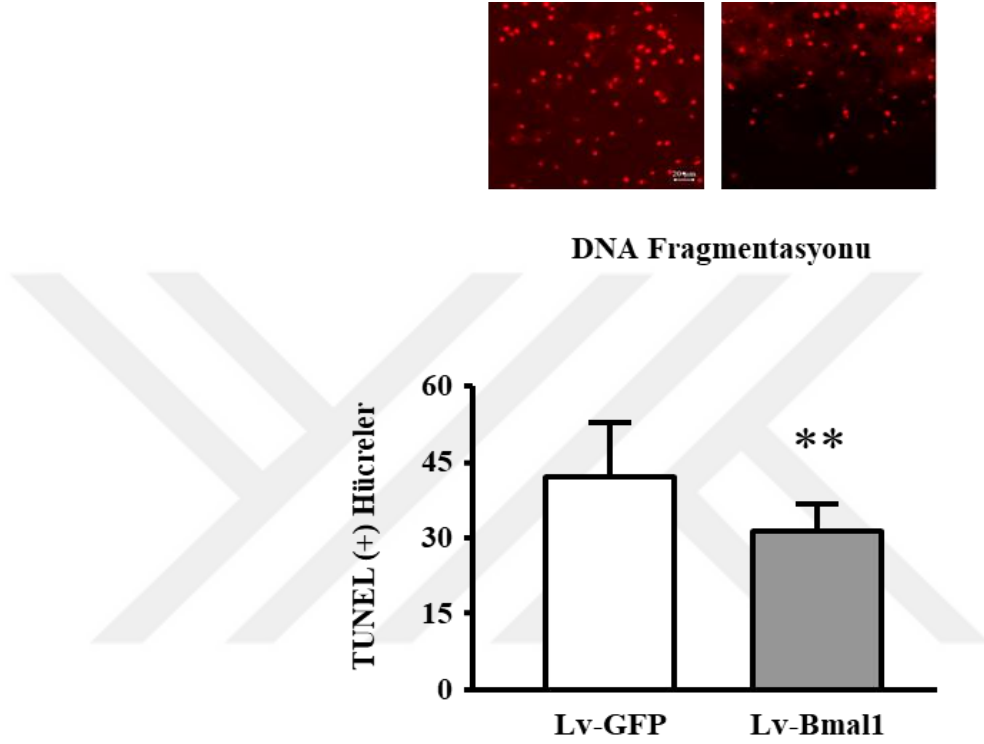
**Şekil 6.4.2.** Travmatik beyin hasarı sonrası akut dönem deney seti farelerden alınan koronal kesitlerden Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunun nöronal sağkalım analizi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

Korteks bölgesinde kontralaterale göre bulunan % NeuN (+) hücre sayısı travmatik beyin hasarı sonrası sırasıyla; Lv-GFP grubunda 26,7, Lv-Bmal1 grubunda 37,8, scrRNA grubunda 30,9, sh-Bmal1 grubunda 26,8 olarak hesaplanmıştır. Lv-GFP grubuna göre, Lv-Bmal1 grubunda kontralaterale göre % NeuN (+) hücre sayısında artış gözlemlenirken istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ) (Şekil 6.4.1). scrRNA grubuna göre, sh-Bmal1 grubunda kontralaterale göre % NeuN (+) hücre sayısında azalma gözlemlenmiştir; fakat sh-Bmal1 grubu scrRNA grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilememiştir (Şekil 6.4.2).

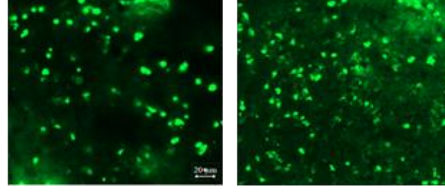
### 6.5 Apoptotik Hücre Tayini

Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası etkilerinin incelenebilmesi için proje kapsamında akut deney seti olarak tanımlanan Set-I deney gruplarındaki farelerin beyinlerinden elde edilen örnekler kuru buz üzerinde dondurulmuş ve dokular kroyostat cihazıyla koronal olarak kesilmiştir. Bu kapsamda korteks bölgesinden alınan koronal kesitlere DNA kırıklarının *in situ* olarak tanımlayan TUNEL boyaması

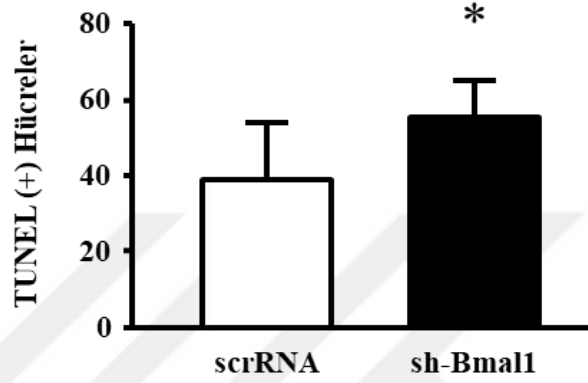
yapılmıştır. Boyama sonrası elde edilen örnekler konfokal mikroskop (LSM 800, Carl Zeiss) kullanılarak görüntülenmiştir. İpsilateral korteks seviyesinden belirlenen 62.500  $\mu\text{m}^2$ 'lik rastgele yedi farklı alandan TUNEL ve DAPI pozitif hücreler sayılmıştır. Korteks bölgesinden belirlenen alanlardaki hücreler sayılarak grupların ortalaması alınarak analiz edilmiştir.



**Şekil 6.5.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası akut dönem deney seti farelerden alınan koronal kesitlerden Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubunun DNA fragmentasyon analizi ile apoptotik hücre tayini. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*\* $p < 0.01$  Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.



### DNA Fragmentasyonu



**Şekil 6.5.2.** Travmatik beyin hasarı sonrası akut dönem deney seti farelerden alınan koronal kesitlerden Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunun DNA fragmentasyon analizi ile apoptotik hücre tayini. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0.05$  scrRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Korteks bölgesinde bulunan TUNEL (+) hücre sayısı travmatik beyin hasarı sonrası sırasıyla; Lv-GFP grubunda 42,06 hücre, Lv-Bmal1 grubunda 31,20 hücre, scrRNA grubunda 39,24 hücre, sh-Bmal1 grubunda 55,45 hücre olarak analiz edilmiştir. Bmal1 ifadesinin artırıldığı Lv-Bmal1 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde apoptotik hücre sayısında azalma tespit edilirken ( $p < 0,01$ ) (Şekil 6.5.1), Bmal1 ifadesinin azaltıldığı sh-Bmal1 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde apoptotik hücre sayısında artış olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ) (Şekil 6.5.2).

Tüm bu veriler kapsamında lentivirüsler aracılığıyla ifadesi artırılan Bmal1'in apoptotik hücre sayısını azalttığı, lentivirüsler aracılığıyla ifadesi azaltılan Bmal1'in ise apoptotik hücre sayısını arttırdığı görülmektedir.

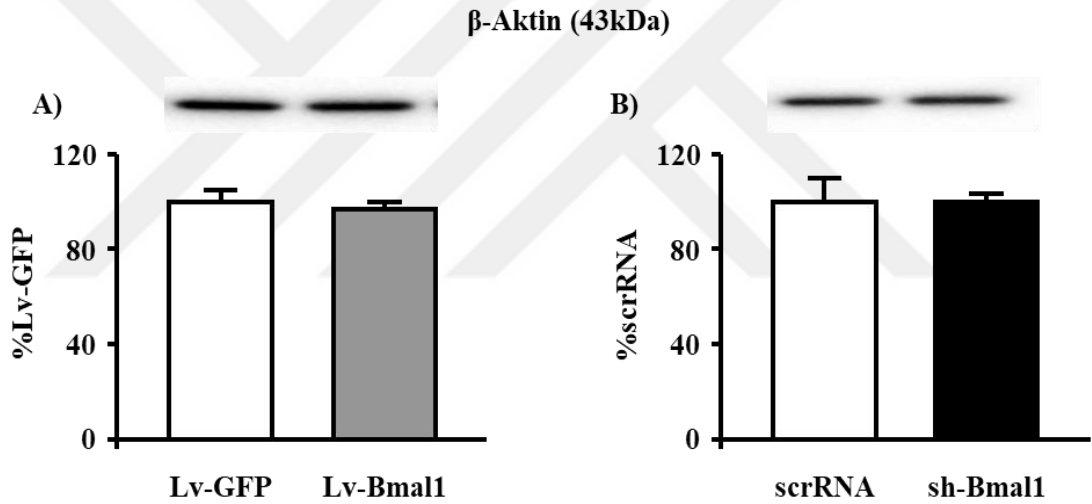


## 6.6. Akut Dönem Western Blot ile Protein Analizleri

Travmatik beyin hasarı sonrası akut dönem Set-I deney setini kapsayan farelerin korteks seviyelerinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi kullanılarak protein analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla “Materyal ve Metod” bölümü 5.8.1 ve 5.8.2 numaralı alt başlıkta belirtilen prosedürler izlenerek protein izolasyonu ve protein konsantrasyon ölçümü yapılmıştır. 5.8.3 numaralı alt başlıkta belirtilen prosedürler izlenerek protein analizleri gerçekleştirilmiştir.

### 6.6.1. $\beta$ -Aktin protein analizi

Akut dönem deney gruplarının korteks seviyesinden alınan protein örneklerinden Western blot yöntemi ile  $\beta$ -Aktin protein seviyesi incelenmiştir.

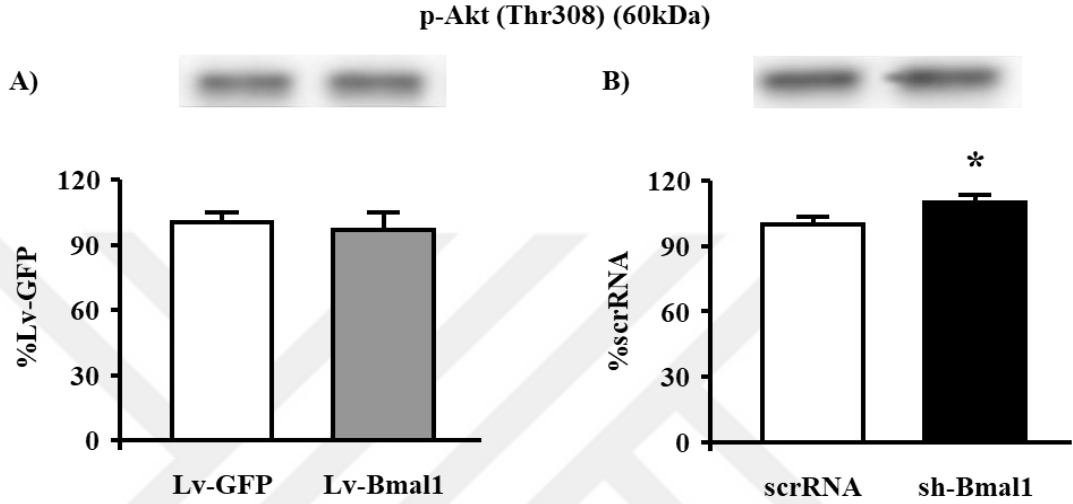


**Şekil 6.6.1.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile  $\beta$ -Aktin protein analizi. **A)** Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubunda  $\beta$ -Aktin protein seviyesi değişimi. **B)** Bmal1 ifadesinin azaltığı deney grubunda meydana gelen  $\beta$ -Aktin protein seviyesi değişimi.

Western Blot sonrasında  $\beta$ -aktin protein ölçümleri Lv-GFP grubuna göre ve scrRNA grubuna göre % oranlanarak hesaplanmıştır. Buna göre Lv-GFP grubu 100,0; Lv-Bmal1 grubu 96,31 olarak hesaplanmıştır. scrRNA grubu 100,0; sh-Bmal1 grubu 99,58 olarak ölçülmüştür (Şekil 6.6.1.1).

### 6.6.2. p-AKT protein analizi

Akut dönem Set-I gruplarının korteks seviyesinden alınan protein örneklerinden Western blot yöntemi ile nörodejeneratif bozuklukların tedavisinde hücrelerin hayatta kalmasını teşvik eden sağkalım kinazı olarak bilinen p-Akt protein seviyesine bakılmıştır.

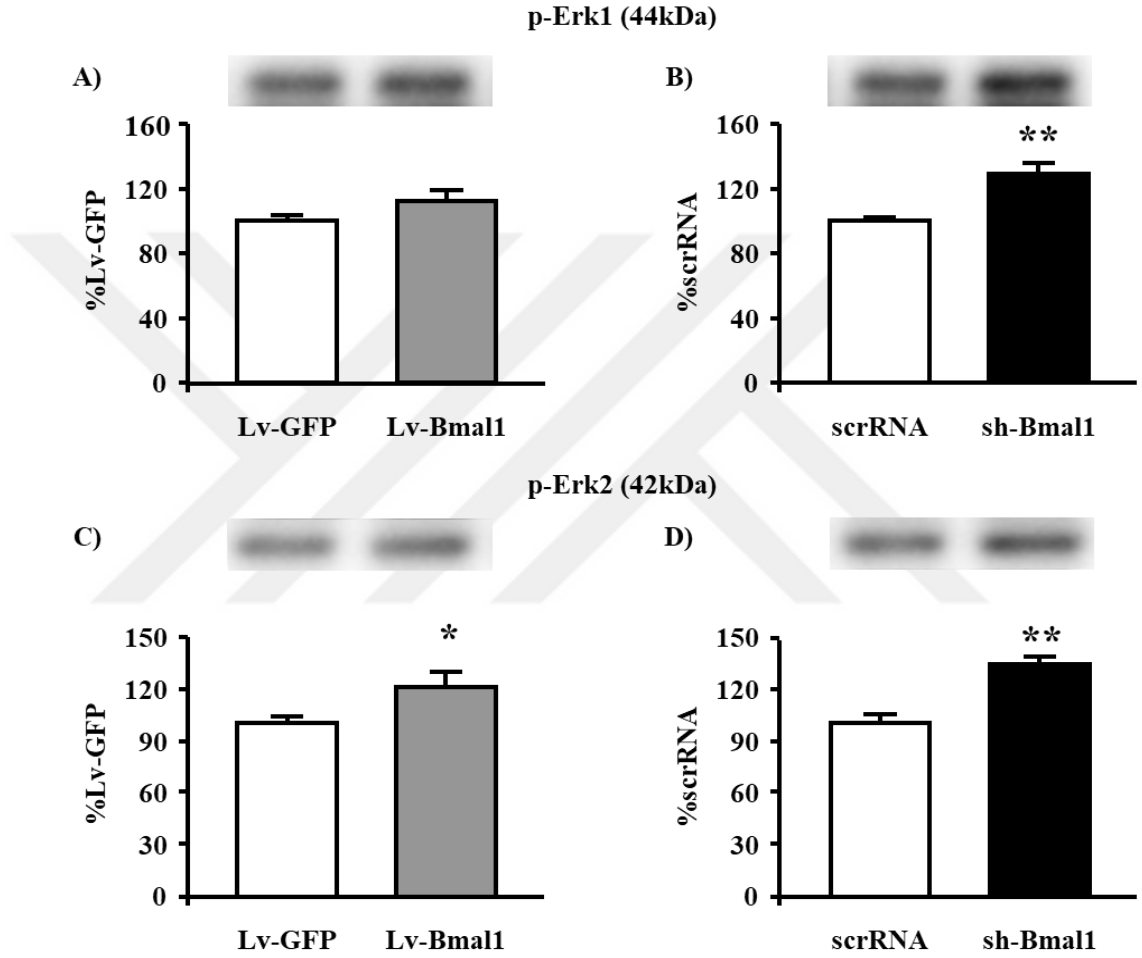


**Şekil 6.6.2.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile p-Akt protein analizi. **A)** Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubundaki p-Akt protein seviyesi değişimi. **B)** Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunda meydana gelen p-Akt protein seviyesi değişimi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0.05$  scrRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Travmatik beyin hasarı sonrası fosforlanan Akt (p-Akt) protein seviyesi Bmal1 ifadesi arttırılan grup üzerine herhangi bir etki göstermemektedir; fakat Bmal1 seviyesi azaltılan grupta kendi kontrol grubu olan scrRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) bir şekilde p-Akt protein seviyesi artmaktadır (Şekil 6.6.2.1).

### 6.6.3. p-Erk1/2 protein analizi

Sağ kalım kinazı olarak bilinen mitojenler, büyüme faktörleri, sitonkinler gibi çok çeşitli hücre dışı uyarılara yanıt olarak aktive edilebilen p-Erk1/2 protein seviyesinin analizi akut dönem deney gruplarının korteks seviyesinden alınan doku örneklerine uygulanmıştır.

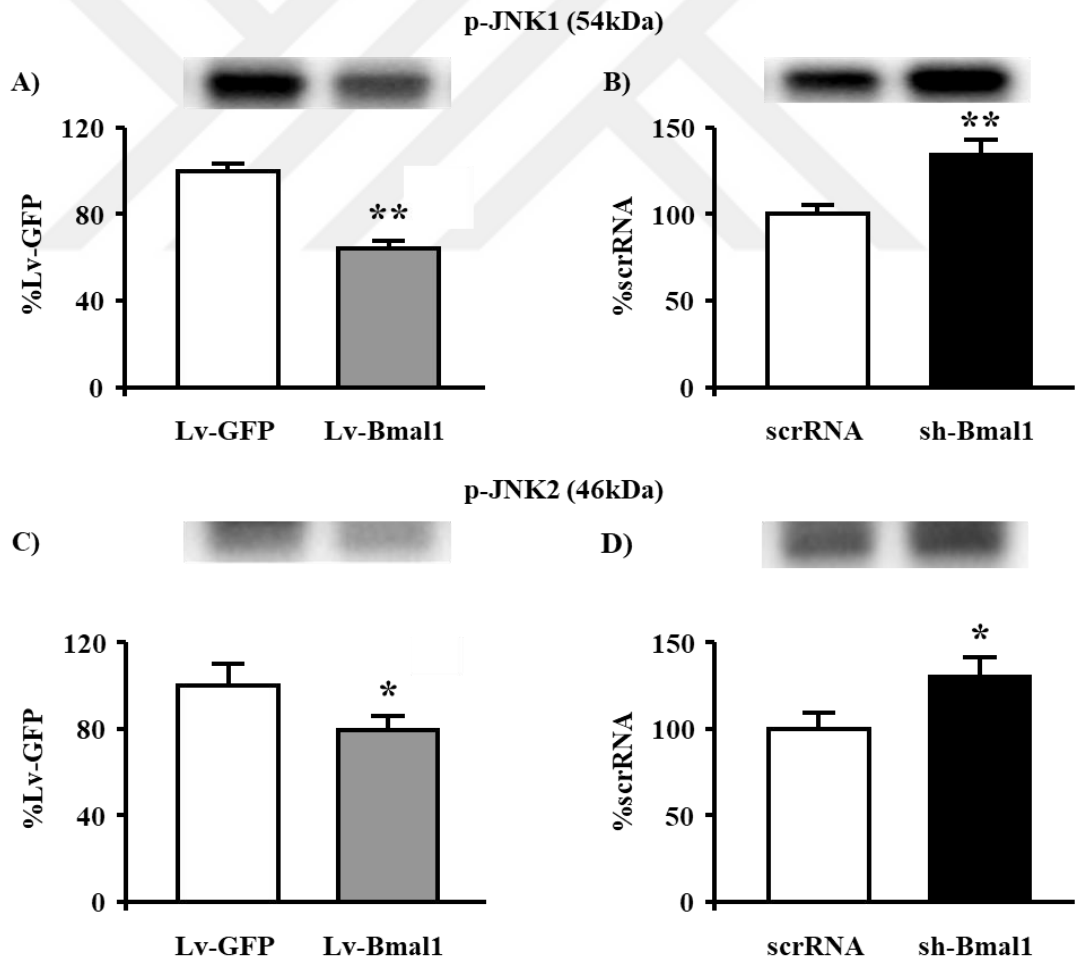


**Şekil 6.6.3.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile p-Erk1/2 protein analizi. **A)** Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubdaki p-Erk1 protein seviyesi değişimi. **B)** Bmal1 ifadesinin azaltığı deney grubunda meydana gelen p-Erk1 protein seviyesi değişimi. **C)** Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubdaki p-Erk2 protein seviyesi değişimi. **D)** Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunda meydana gelen p-Erk2 protein seviyesi değişimi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0,05$  GFP grubuna ve \*\* $p < 0,01$  scrRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Travmatik beyin hasarı sonrası kendi kontrolü olan Lv-GFP grubu ile kıyaslandığında Lv-Bmal1 grubunda p-Erk1/2 protein seviyesinde artış gözlemlenirken, p-Erk2 protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). sh-Bmal1 grubu kendi kontrol grubu olan scrRNA grubu ile karşılaştırıldığında p-Erk1/2 protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış olduğu görülmüştür ( $p<0,01$ ) (Şekil 6.6.3.1).

#### 6.6.4. p-SAPK-JNK1/2 protein analizi

Akut dönem Set-I gruplarının korteks seviyesinden alınan protein örneklerinden Western blot yöntemi ile enflamatuvar sitokinler gibi çeşitli çevresel stresler tarafından aktive edilen stresle aktive olan bir protein kinaz olan p-SAPK-JNK1/2 protein seviyesi incelenmiştir.

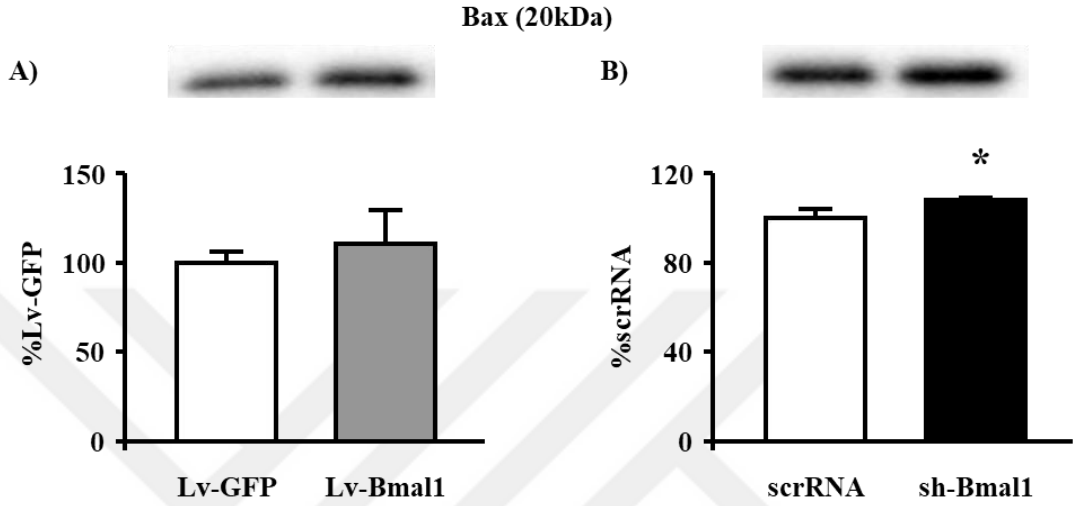


**Şekil 6.6.4.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile p-SAPK-JNK1/2 protein analizi. **A)** Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubundaki p-SAPK-JNK1 protein seviyesi değişimi. **B)** Bmal1 ifadesinin azaltığı deney grubunda meydana gelen p-SAPK-JNK1 protein seviyesi değişimi. **C)** Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubundaki p-SAPK-JNK2 protein seviyesi değişimi. **D)** Bmal1 ifadesinin azaltığı deney grubunda meydana gelen p-SAPK-JNK2 protein seviyesi değişimi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  GFP grubuna ve scrRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Hücre stresine neden olan herhangi bir stres uyarını tarafından aktive olabilen kinaz grubu ailesi üyelerinden p-SAPK-JNK1 protein seviyesi Bmal1 ifadesinin arttırıldığı Lv-Bmal1 grubunda anlamlı bir şekilde azalırken; Bmal1 ifadesinin azaltıldığı sh-Bmal1 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ( $p < 0,01$ ). Yine aynı şekilde Lv-Bmal1 grubunda p-SAPK-JNK2 protein seviyesi istatistiksel anlamlı şekilde bir azalma görülürken; sh-Bmal1 grubunda p-SAPK-JNK2 protein seviyesi istatistiksel anlamlı şekilde artış olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ) (Şekil 6.6.4.1).

### 6.6.5 Bax protein analizi

Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyesi olarak bilinen apoptoz sinyal mekanizmasında görevli olan Bax protein seviyesi akut dönem deney grupları korteks dokularından analiz edilmiştir.

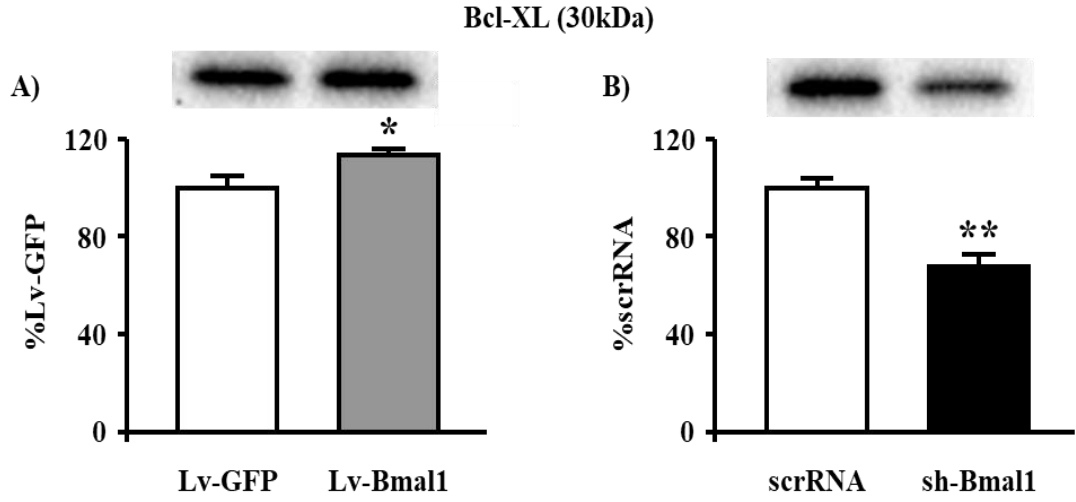


**Şekil 6.6.5.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile Bax protein analizi. **A)** Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubundaki Bax protein seviyesi değişimi. **B)** Bmal1 ifadesinin azaltığı deney grubunda meydana gelen Bax protein seviyesi değişimi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0.05$  scrRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Pro-apoptotik protein olarak bilinen Bax protein seviyesinde Lv-Bmal1 grubunda kendi kontrolü olan Lv-GFP grubuna göre artış görülürken istatistiksel anlamlılık tespit edilememiştir; sh-Bmal1 grubunda kendi kontrolü olan scrRNA grubuna göre istatistiksel anlamlı bir şekilde artma olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ) (Şekil 6.6.5.1).

### 6.6.6 Bcl-XL protein analizi

Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyesi olan ve apoptozu iki farklı mekanizma üzerinden engelleyen Bcl-XL protein seviyesi akut dönem Set-I gruplarının korteks seviyesinden alınan protein örneklerinden Western blot yöntemi ile belirlenmiştir.

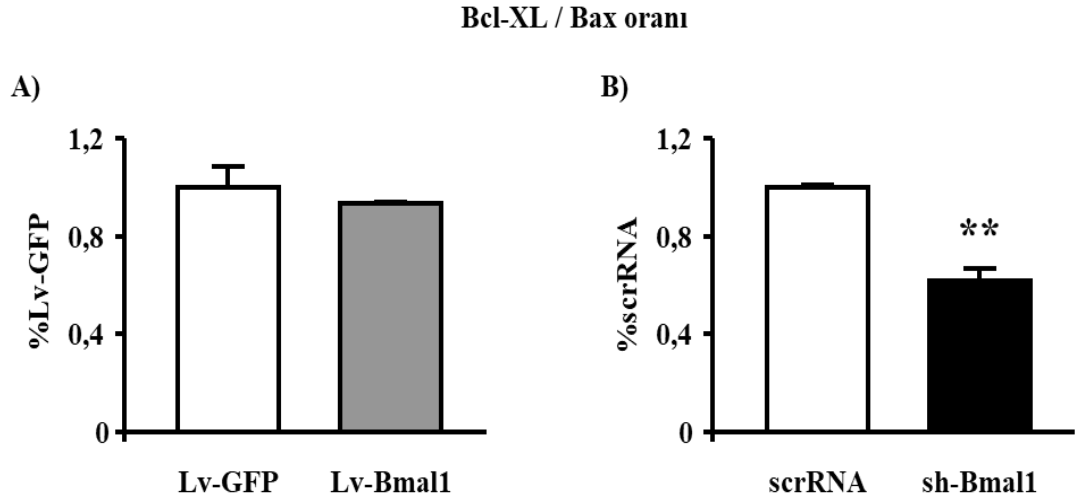


**Şekil 6.6.6.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile Bcl-XL protein analizi. **A)** Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubundaki Bcl-XL protein seviyesi değişimi. **B)** Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunda meydana gelen Bcl-XL protein seviyesi değişimi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0.05$  GFP grubuna göre, \*\* $p < 0,01$  scrRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

TUNEL boyaması vasıtasıyla apoptotik hücre sayısının belirlenmesinden sonra apoptoz sinyal yolağında görevli anti apoptotik bir protein olan Bcl-XL protein seviyesi Western blot yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Bmal1 ifadesinin arttırıldığı Lv-Bmal1 grubunda Bcl-XL protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış görülürken ( $p < 0,05$ ); Bmal1 ifadesinin azaltıldığı sh-Bmal1 grubunda Bcl-XL protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,01$ ) (Şekil 6.6.6.1).

### 6.6.7 Bcl-XL/ Bax protein analizi

Akut dönem gruplarından elde edilen korteks seviyelerinden % Bcl-XL protein seviyesi, % Bax protein seviyesine bölünerek Bcl-XL/ Bax protein oranı katsayı olarak analiz edilmiştir.



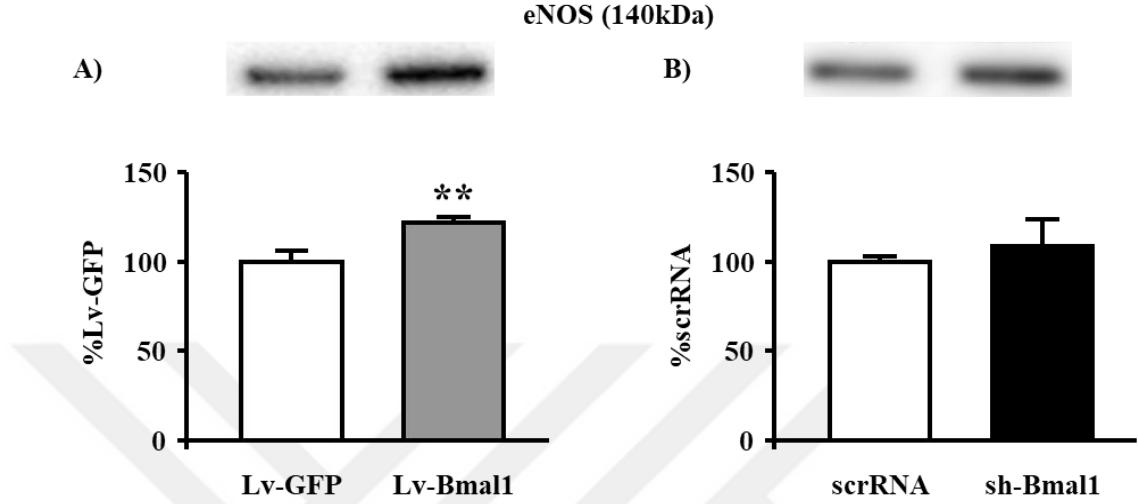
**Şekil 6.6.7.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile Bcl-XL/ Bax protein oranı. **A)** Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubundaki Bcl-XL/ Bax protein oran değişimi. **B)** Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunda meydana gelen Bcl-XL/ Bax protein oran değişimi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*\* $p < 0,01$  scrRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Anti apoptotik bir protein olan Bcl-XL ile pro apoptotik bir protein olan Bax protein oranı incelenmiştir. Bmal1 ifadesinin azaltıldığı sh-Bmal1 grubunda Bcl-XL/ Bax proteinleri oranında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde katsayıda azalma olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,01$ ) (Şekil 6.6.7.1).



### 6.6.8 eNOS protein analizi

Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) protein analizi Set-I gruplarından elde edilen korteks seviyesinden alınan dokulardan bakılmıştır.



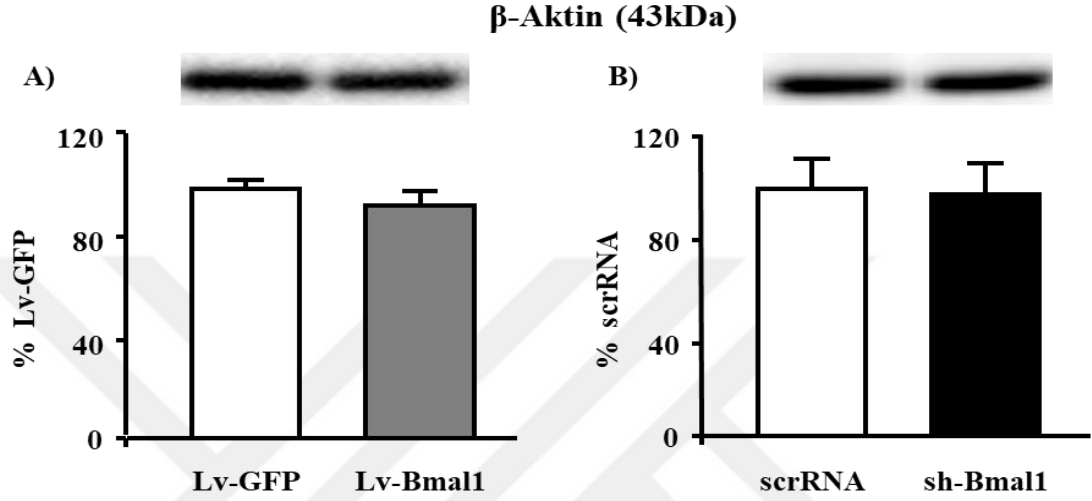
**Şekil 6.6.8.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile eNOS protein analizi. **A)** Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubundaki eNOS protein seviyesi değişimi. **B)** Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunda meydana gelen eNOS protein seviyesi değişimi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*\* $p < 0,01$  GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Lentivirüsler aracılığıyla ifadesi arttırılan Bmal1'intravmatik beyin hasarı sonrası eNOS protein seviyesini arttırdığı ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlılık gösterdiği tespit edilmiştir ( $p < 0,01$ ). Lentivirüsler aracılığıyla ifadesi azaltılan Bmal1' i ifade eden sh-Bmal1 grubunda ise travmatik beyin hasarı sonrası eNOS protein seviyesinde artış olduğu; ancak bu artışın istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık göstermediği görülmüştür (Şekil 6.6.8.1).

## 6.7 Subakut Dönem Western Blot ile Protein Analizleri

### 6.7.1 $\beta$ -Aktin protein analizi

Subakut dönem Set-II gruplarının korteks seviyesinden alınan protein örneklerinden Western blot yöntemi ile  $\beta$ -Aktin protein seviyesi incelenmiştir.

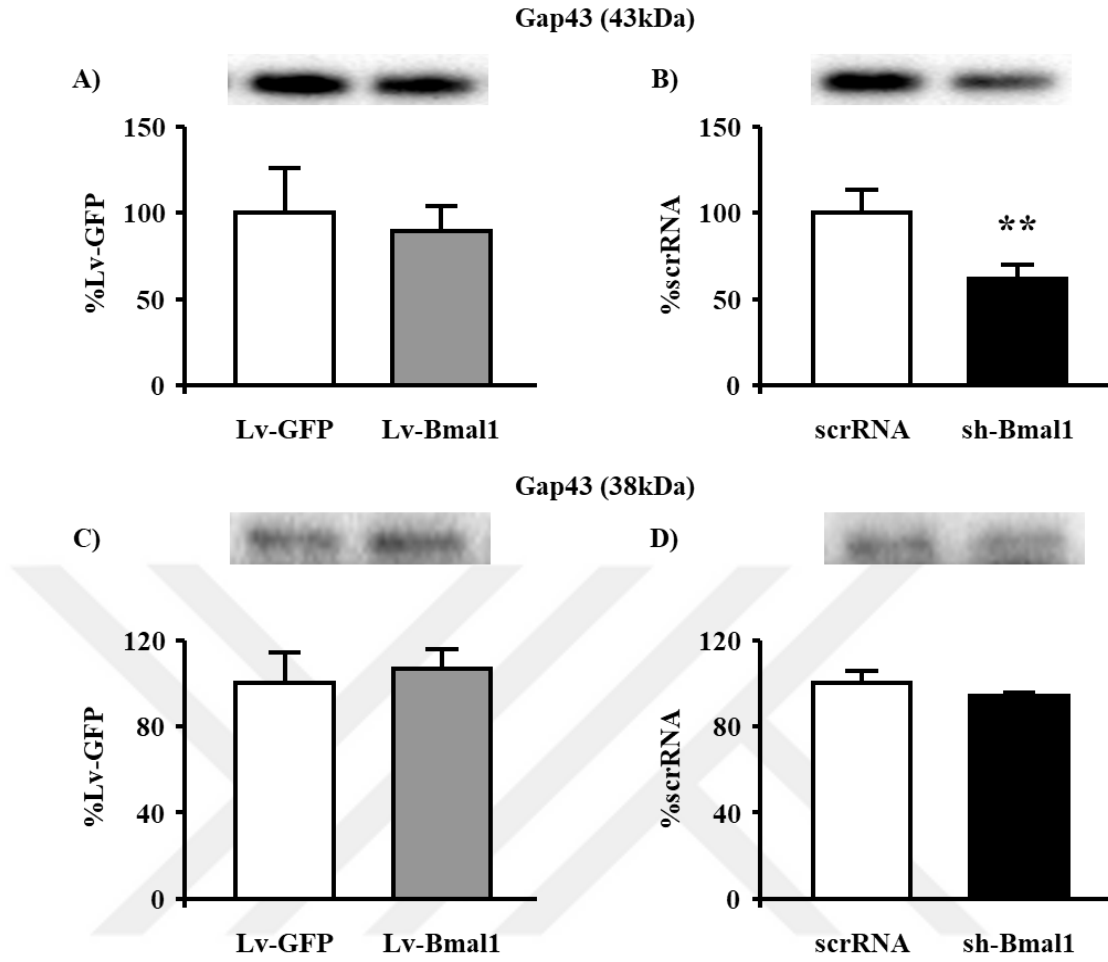


**Şekil 6.7.1.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası subakut dönem ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile  $\beta$ -Aktin protein analizi. **A)** Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubundaki  $\beta$ -Aktin protein seviyesi değişimi. **B)** Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunda meydana gelen  $\beta$ -Aktin protein seviyesi değişimi.

Western Blot sonrasında  $\beta$ -aktin protein ölçümleri Lv-GFP grubuna göre ve scrRNA grubuna göre % oranlanarak hesaplanmıştır. Buna göre Lv-GFP grubu 100,0; Lv-Bmal1 grubu 91,49 olarak hesaplanmıştır. scrRNA grubu 100,0; sh-Bmal1 grubu 97,66 olarak ölçülmüştür (Şekil 6.7.1.1).

### 6.7.2 Gap43 protein analizi

Büyüme ilişkili protein 43 (Gap43), nöronlara özgü bir protein olup akson büyümesinde, rejenerasyonda, plastisitesitede rol oynamaktadır. Subakut dönem Set-II gruplarının korteks seviyesinden alınan protein örneklerinden Western blot yöntemi ile Gap43 protein seviyesi belirlenmiştir.



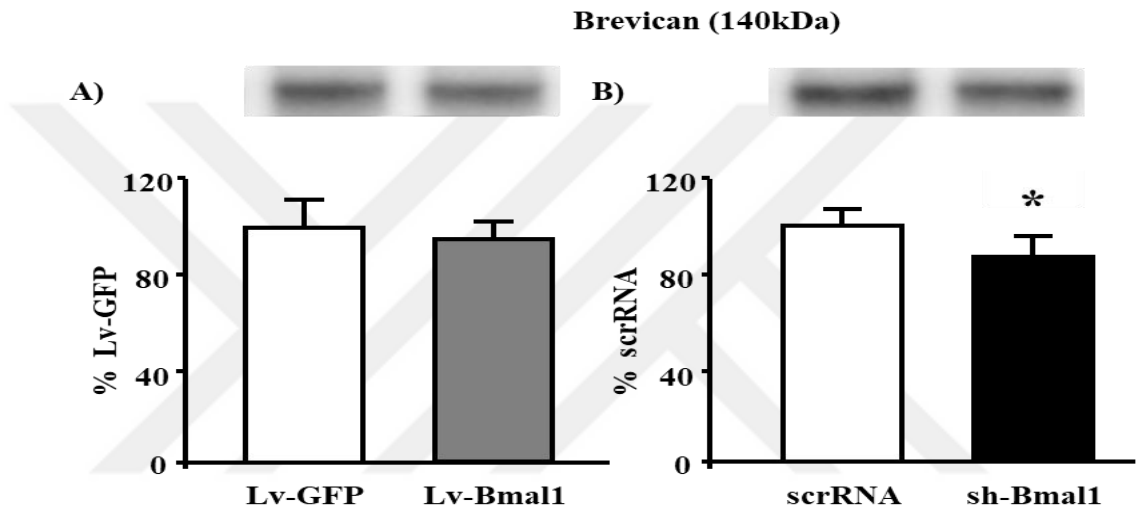
**Şekil 6.7.2.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası suakut dönem ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile Gap43 protein analizi. **A)** Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubu Gap43 (43 kDa) protein seviyesi değişimi. **B)** Bmal1 ifadesinin azaltığı deney grubunda meydana gelen Gap43 (43 kDa) protein seviyesi değişimi. **C)** Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubu Gap43 (38 kDa) protein seviyesi değişimi. **D)** Bmal1 ifadesinin azaltığı deney grubunda meydana gelen Gap43 (38 kDa) protein seviyesi değişimi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*\* $p < 0,01$  scrRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

İpsilateral korteks seviyesinden subakut dönem doku örneklerinden yapılan analizlerde Bmal1 ifadesi arttıran grupta Lv-GFP grubuna göre Gap43 (43kDa) protein ifadesi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalırken Gap43 (38kDa) protein ifadesi artmaktadır; fakat bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bmal1 ifadesinin

azaltıldığı sh-Bmal1 grubunda scrRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede Gap43 protein ifadesi azalmaktadır ( $p<0,01$ ); Gap43 (38kDa) protein ifadesi ise anlamlı olmasa da azalmaktadır (Şekil 6.7.2.1).

### 6.7.3 Brevican protein analizi

Subakut dönem Set-II gruplarının korteks seviyesinden alınan protein örneklerinden aksonal büyümeyi inhibe eden bir protein olarak bilinen Brevican protein seviyesi analiz edilmiştir.

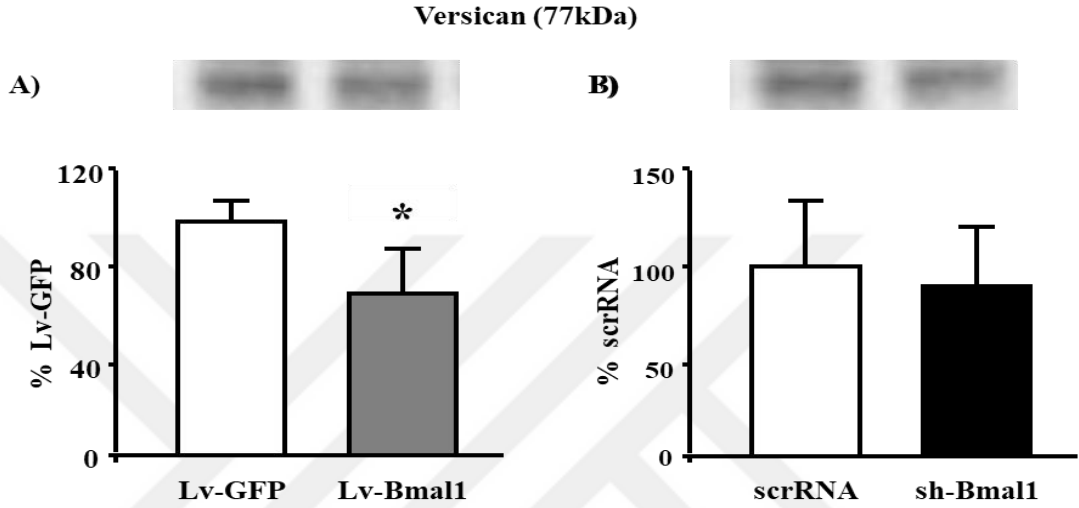


**Şekil 6.7.3.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası suakut dönem ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile Brevican protein analizi. **A)** Bmal1 ifadesinin artırıldığı deney grubundaki Brevican protein seviyesi değişimi. **B)** Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunda meydana gelen Brevican protein seviyesi değişimi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p<0,05$  scrRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Travma sonrası subakut dönem ipsilateral korteks seviyesinden yapılan Brevican protein analizi sonucunda Lv-Bmal1 grubunda Lv-GFP grubuna göre Brevican protein seviyesinde anlamlı olmasa da bir azalmanın olduğu görülmüştür. Bmal1 ifadesinin azaltıldığı sh-Bmal1 grubunda scrRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede Brevican protein ifadesi azalmaktadır ( $p<0,05$ ) (Şekil 6.7.3.1).

#### 6.7.4 Versican protein analizi

Normal fizyolojik süreçlerde ve patofizyolojik durumlarda nöronal gelişmede ve aksonal büyümenin engellenmesinde rol oynayan Versican protein analizi proje kapsamında ipsilateral korteks seviyelerinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemiyle analiz edilmiştir.



**Şekil 6.7.4.1.** Travmatik beyin hasarı sonrası suakut dönem ipsilateral korteks seviyesinden alınan doku örneklerinden Western blot yöntemi ile Versican protein analizi. **A)** Bmal1 ifadesinin arttırıldığı deney grubdaki Versican protein seviyesi değişimi. **B)** Bmal1 ifadesinin azaltıldığı deney grubunda meydana gelen Versican protein seviyesi değişimi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p<0,05$  Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Subakut dönem doku örneklerinden ipsilateral korteks seviyesinden yapılan Versican protein analizlerinde Bmal1 ifadesi arttıran grupta Lv-GFP grubuna göre Versican protein ifadesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. Bmal1 ifadesinin azaltıldığı sh-Bmal1 grubunda scrRNA grubuna göre Versican protein ifadesi ise anlamlı olmasa da yine azalmaktadır (Şekil 6.7.4.1).

## 7. TARTIŞMA

Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ölüm ve çeşitli engelli durumların önemli bir nedeni olarak kabul edilen travmatik beyin hasarı, dünya çapında önemli bir sağlık ve sosyoekonomik sorun olarak kabul edilir (130-132). 2010 yılında Avrupa’da travmatik beyin hasarının toplam yıllık ekonomik maliyetinin 33 milyar Euro olduğu ve hasta başına 8,809 Euro’ ya tekabül ettiği tahmin edilmektedir (133). Travmatik beyin hasarı ile ilişkili hasta ve yaralanma heterojenliği, klinik belirtilerinin geniş yelpazesi ile birlikte, önlenmesi, teşhisi ve tedavisinde önemli bir zorluk oluşturmaya devam etmektedir (134). Travmatik beyin hasarının kaynağı; yapısal, hücrel ve vasküler hasarın bir karışımıdır. İlk darbeden kaynaklanan yapısal hasarın bir sonucu olarak karmaşık bir moleküler ve hücrel kaskad ile reaksiyonlar etkinleştirilir. Hasarını en aza indirmek için terapötik müdahaleler, ilk darbe hasarını önlemek ve sürekli hücre hasarının moleküler ve hücrel kaskadını kısıtlamak için yönlendirilir. Şimdiye kadar, ilk darbe hasarı için etkili bir tedavi olmamakla birlikte daha fazla nöronal hasarı önlemek için tedavi arayan, sinir ağının yeniden düzenleyen ve fonksiyonel iyileşmeyi geliştirmeye çalışan çok sayıda çalışma sürdürülmektedir (135). Bu tez çalışması kapsamında sirkadiyen ritmin temel komponentlerinden biri olan, günlük fizyolojik fonksiyonlarımızın yanında hastalıkların patofizyolojik süreçlerinde de önemli bir rol oynayan Bmal1 proteininin travmatik beyin hasarı sonrası rolü incelenmiştir. Moleküler incelemelerin yanı sıra yapılan davranış deneyleriyle beraber travma sonrası fonksiyonel geri kazanım ve davranış mekanizmalarına etkisinin aydınlatılması hedeflenmiştir. Hem *in vivo* hem de *ex vivo* gen terapisi bağlamında gen aktarımı için güçlü bir aracı olan lentiviral vektörler aracılığıyla Bmal1 ifadesi artırılıp veya azaltılarak *in vivo* ortamda soğukla indüklenen travmatik beyin hasarı sonrası Bmal1’ini) hasar hacmi ve beyin ödeme, ii) apoptotik hücre ölümüne, iii) nöronal sağkalım oranına, iv) sinyal iletim yollarına, v) motor koordinasyona, depresyona, anksiyeteye olan etkisi değerlendirilmiştir.

Travmatik beyin hasarına bağlı olarak meydana gelen birincil yaralanmalar, beyin dokusunun deformasyonuna ve normal beyin fonksiyonunun bozulmasına neden olur (136). Beynin travmaya karşı enflamatuvar tepkisi çok faktörlüdür ve bu enflamatuvar olayların bir sonucu olarak eş zamanlı ortaya çıkan beyin ödem oluşumu,

ardından artan kafa içi basıncı travmatik beyin hasarının olumsuz sonuçlarına katkıda bulunur (137). Aynı zamanda homeostatik iyonik gradyanların kaybıyla meydana gelen iyonik pompaların bozulmasıyla ya da seçili iyon kanallarının aktivasyonu ile su, hücreler arası boşlıktan hücre içi boşluğa hareket ederek hücre içerisine yüksek miktarda su girişine izin vererek ödem oluşmasına sebep olur (138, 139). Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası hasar hacmine ve beyin ödeminde etkisi akut dönem deney seti örneklerine cresyl violet boyaması yapılarak incelenmiştir. Bmal1 ifadesinin arttırılmasıyla beraber hasar hacmi ve beyin ödeminde istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalma görülürken, Bmal1 ifadesinin azaltılmasıyla hasar hacmi ve beyin ödeminde istatistiksel olarak anlamlı seviyede artma olduğu gösterilmiştir. Literatürde bu tez çalışmamızda elde edilen sonucu destekleyen bir çalışmada, nörodejeneratif bir hastalık olan beyin felcinin sirkadyen ritme bağlı olarak günün zaman dilimlerine göre farklılık gösterdiği, gece yarısı (00.00) iskemik / reperfüzyon hasarının Bmal1, Per1 ve Clock sirkadyen proteinlerinin artan ekspresyonları ile ilişkili olarak önemli ölçüde azalan hasar hacmi ve ödemle sonuçlandığı gösterilmiştir (18). Sıçanlarda serbest düşen darbe kaynaklı oluşturulan travmatik beyin hasarı modelinde, travmatik beyin hasarından 24 saat önce rekombinant Bmal1 proteini ile Bmal1 seviyeleri arttırılan sıçanların beyin ödeminde azalma olduğu gösterilmiştir (140). Elde edilen bu çalışmadaki sonuçlara paralel olarak intraserebral hemoraji takiben ikincil hasar mekanizmalarında Bmal1'in rolünü inceleyen bir çalışmada, intraserebral hemoraj modeli oluşturulan sıçanlarda, lentivirüsler aracılığıyla Bmal1 ifadesi arttırılan grubun vektör grubuna göre intraserebral hemoraj sonrası ödem miktarında önemli derecede azalma olduğu belirtilmiştir. Bmal1'in intraserebral hemoraj kaynaklı beyin ödemi üzerindeki koruyucu etkisi vurgulanmıştır (141).

Apoptotik hücre ölümü, özellikle mitokondrinin aracılık ettiği programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanır ve terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP nick uç etiketlemesi (TUNEL) kullanılarak *in situ* tespit edilebilen internükleozomal DNA fragmentasyonu ile sonuçlanır (142). Travmatik hasara karşı fizyolojik ve koruyucu bir yanıtı temsil eden apoptotik hücre ölümü, ikincil beyin hasarının temel özelliğidir ve insan hipokampusunda travmatik beyin hasarından 1 yıl sonrasına kadar belirgindir (56, 143). Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası apoptotik hücre ölümüne etkisi TUNEL yöntemi kullanılarak *in situ* tespit edilmiştir. Lentivirüsler

aracılığıyla Bmal1 ifadesinin arttıldığı grupta apoptotik hücre ölümünde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma görülürken, lentivirüsler aracılığıyla Bmal1 ifadesi azaltılan grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde apoptotik hücre ölümünde artış görülmüştür. Bmal1'in TM3 Leyding hücre hattında apoptoz ve testosteron salgılanmasındaki rolünü inceleyen bir çalışmada, siRNA kullanılarak inhibe edilen Bmal1'in, Leyding hücrelerinde apoptoz seviyesini arttırdığı görülmüştür (144). Yine astrositlerde Bmal1'in silinmesinin hipotalamik sirkadyen fonksiyonu bozduğu, hipotalamik astrositlerin apoptozuna yol açtığı gösterilmiştir (145). Tez çalışmamızda elde edilen sonuçlar Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası apoptoz mekanizmalarında rol oynadığı göstermektedir.

Travmatik beyin hasarı sonrası Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası nöronalsağkalıma etkisinin belirlenebilmesi akut dönem deney seti kesitlerine nöronların işaretleyicisi olan NeuN immün boyaması yapılmış, nöronalsağkalım oranı değerlendirilmiştir. Lentiviral virüer aracılığıyla Bmal1 ifadesi arttırılan grupta kontralaterale göre % NeuN (+) hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Lentiviral virüer aracılığıyla Bmal1 ifadesi azaltılan grupta kontralaterale göre % NeuN (+) hücre sayısında azalma görülürken istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilememiştir. N2A hücrelerinde Bmal1'in oksijen glikoz yoksunluğunda (hipoksik koşullarda) hücre sel sağkalım oranına etkisi moleküler klonlama teknikleri ile Bmal1 ifadesi arttırılmasıyla anlamlı bir şekilde artmıştır (128). Önemli bir serebrovaskular hastalık olan intraserebral hemoroji takiben ikincil hasar mekanizmalarında Bmal1'in rolünü inceleyen bir çalışmada, intraserebral hemoroji modeli oluşturulan sıçanlarda korteks ve hipokampus bölgelerinde hayatta kalan nöron sayısının lentivirüslerle Bmal1 ifadesi arttırılan grupta önemli ölçüde arttığı Nissl boyaması yapılarak gösterilmiştir (141).

Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası hücre içi sinyal mekanizmalarına olan etkisinin incelenmesi için Western blot yöntemi ile protein miktar analizleri yapılmıştır. Protein ekspresyon çalışmaları için akut dönem ve subakut dönem deney seti farelerinin ipsilateral korteks dokuları kullanılmıştır. Bmal1 protein seviyesine bağlı olarak "Akt, Erk, SAPK/JNK" gibi sağkalım ve stres kinaz ile "Bcl-xL ve Bax" gibi apoptotik süreçlerle ilgili protein seviye değişimleri tespit edilerek Bmal1'in



nöronal sağkalım ve apoptotik hücre sinyal mekanizmaları ile etkileşimi incelenmiştir. Bmal1'in travma sonrası kan beyin bariyeri geçirgenliği değişimine ve vasküler fonksiyona etkisi "eNOS" protein seviyelerine bakılarak değerlendirilmiştir.

Akt sinyal yolunun, sinyal iletimi, hücre proliferasyonu, apoptozun baskılanması, nöronların hayatta kalmasına aracılık etmesi, hücre döğüsünün ilerlemesi, transkripsiyonu düzenlemesi ve metabolizma gibi biyolojik süreçleri düzenlediği bilinmektedir (146-148). Fosforlanan Akt, Bad, GSK-3, forkhead transkripsiyon faktörleriveye kasapaz-9 gibi çeşitli hedefler etkisiz hale getirerek hücrel sağkalımı destekler ve apoptozu önler (149-155). Yapılan immünohistokimyasal ve western blot çalışmalarında travmatik beyin hasarından 1 saat sonra hasarlı kortekste fosforlanan Akt miktarının azaldığını; ancak 4 saatte fosforlanan Akt miktarının arttığı gösterilmiştir. Hipokampusun CA1 bölgesinde travma sonrası fosforlanan Akt miktarında artış olduğu tespit edilmiştir (156). Lentiviral vektörler aracılığıyla Bmal1 ifadesinin arttırılıp azaltılmasıyla, travmatik beyin hasarı sonrası fosforlanan Akt (p-Akt) protein seviyesi Bmal1 ifadesi arttırılan grup üzerine herhangi bir etki gösterilmezken; Bmal1 seviyesi azaltılan grupta kendi kontrol grubu olan scrRNA grubuna göre istatistiksel anlamlı bir şekilde p-Akt protein seviyesi artmaktadır. Karaciğerde hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda p-Akt seviyelerindeki zamansal değişiklikleri inceleyen çalışmada 2 gün boyunca sabit karanlıkta tutulan Bmal1<sup>-/-</sup> mutant farelerin, Per1,2<sup>-/-</sup> mutant farelerin aksine ne p-Akt seviyelerinde ne de gen ifadesinde önemli ritimler gözlemlenmemiştir (157). Rekombinant adenovirüs kullanılarak Clock- Bmal1'in kardiyak L tipi kalsiyum kanallarını nasıl düzenlediğini inceleyen bir çalışmada ise, Clock- Bmal1 aşırı ifadesinin önemli derecede p-Akt (Thr308) seviyesini arttırdığı; ancak ayrı ayrı Clock ve Bmal1 aşırı ifadesinin p-Akt (Thr308) seviyesini etkilemediği gözlemlenirken, p-Akt seviyesinde meydana gelen bu artışın Clock ve Bmal1'in birlikte ifade edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (158).

Erk 1/2 sinyal yolağı, hücre dışı sinyalleri hücre içi hedeflere ileten MAPK ailesi üyelerinden biridir. Hücre çoğalması, farklılaşması, çeşitli dışsal streslere hücre tepkisi gibi temel birçok sürecin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (159). Travmatik beyin hasarı sonrası hem Bmal1 ifadesi arttırılmasının hem de Bmal1 ifadesi

azaltılmasının p-Erk 1/2 protein seviyesinde bir artışa neden olduğu bulunmuştur. Literatürde yer alan kıkırdak sirkadiyen geni Bmal1'in temporomandibular eklem osteoartritinde MAPK/ ERK sinyal yolu ilişkisini araştıran bir çalışmada, Bmal1 ifadesinin, ERK ifadesinin inhibe edilmesinden etkilenmediği; ancak Bmal1 ifadesinin siRNA yoluyla inhibisyonunun Erk fosforilasyonunun aktivasyonuna (p-Erk) yol açtığı ve Bmal1'in aşırı ifadesinin fosforlanmış Erk yukarı regülasyonunun önemli derecede geciktirdiği söylenmektedir (160). Oksijen glikoz açlığı sonrası Bmal1'in hücre hayatta kalmayı, hücre içi proteinlerle etkileşimini ve melatonin ekspresyonunu nasıl düzenlediğini inceleyen diğer bir çalışmada ise, Bmal1 aşırı ifadesinin Erk fosforilasyonunu arttırdığı, Bmal1 inhibisyonunun ise Erk fosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir (128).

JNK sinyal yolu, hücre stresine neden olan herhangi bir iç ve dış uyaran tarafından aktive edilebilen bir kinaz grubu olan stresle aktive olan protein kinaz (SAPK) grubuna dahil olan mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ailesi üyesidir (161). Merkezi sinir sisteminde fizyolojik ve patolojik koşullarda merkezi sinir sistemi hücrelerinin kritik düzenleyicisi olan SAPK/JNK sinyal yoludur. Merkezi sinir sistemi hücreleri, nörodejeneratif hastalıklarda apoptoza yol açan JNK seviyelerini arttıran bir stres tepkisini tetikler (161-163). MAPK ailesinin üyelerinden JNK ve p38, proenflamatuar uyanlar, hücre ve çevresel stresler tarafından aktive edilmektedirler (164). Li ve arkadaşlarının 2022' de travma sonrası Bmal1 etkisini inceleyen çalışmalarında rekombinant Bmal1 proteini kullanılarak Bmal1 ifadesi arttırılan ve siRNA yoluyla Bmal1 ifadesi azaltılan sıçanlarda Bmal1'deki bir azalmanın, p38 MAPK fosforilasyonunu aktive ederek *in vivo* patolojik semptomları şiddetlendirilebileceği tespit edilmiştir (140). Tüm bu literatür bilgileri altında tez çalışmamızda beklenildiği gibi Bmal1 ifadesinin arttırıldığı grupta fosforlanan JNK protein seviyesinde (p-JNK) anlamlı bir derecede azalma görülürken Bmal1 ifadesinin azaltıldığı grupta p-JNK seviyesinde anlamlı derecede artış görülmüştür.

Apoptotik hücre ölümü, travmatik beyin hasarı sonrası prognozu etkileyen önemli bir faktördür (165). Yapılan çalışmalar travmatik beyin hasarı sonrası apoptozun transkripsiyonel seviyede ve transkripsiyon sonrası seviyede düzenlenebileceğini, pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein fosforilasyonundaki değişikliklerin apoptotik nöronal hücre ölüm mekanizmasını aydınlatılmak için

yardımcı olabileceğini göstermiştir (166, 167). Pro ve anti apoptotik protein faktörleri arasındaki dengede, hücre ölümünü destekleyen proteinlerin ekspresyonuna doğru bir kaymanın apoptotik hücre ölümünün altında yatan mekanizmalardan biri olduğu kabul edilmektedir (168). Apoptozun anahtar düzenleyicilerinden biri olan B-cell lymphoma-extra large (Bcl-XL) mitokondride lokalize olan B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) ailesinin antiapoptotik proteinlerinden biridir. Nöronalsağkalım için gereklidir ve beynin patolojik süreçleri sırasında oksijen veya glikoz eksikliklerinin neden olduğu nöronal hasarlarda koruyucu rol oynamaktadır (169, 170). Sıçan travmatik beyin hasarı modelinde nöronal kök hücre transplantasyonunun travmatik beyin hasarının iyileşmesine etkisini inceleyen bir çalışmada, nöral kök hücre transplasyonunun operasyondan sonra 7. Gündeki Bcl-XL ekspresyonundaki artışa bağlı olarak nöronal apoptozu önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir (171). Bax apoptotik uyarılara karşı hücrel duyarlılığı arttırarak hücre ölümünü hızlandıran Bcl-2 ailesinin proapoptotik proteinlerinden biridir (169, 172). Travmatik serebral kontüzyon sonrası apoptozun nörolojik sonuca etkisi inceleyen klinik bir çalışmada, epilepsi hasta örneklerinde perikontüzyonel dokuda Bax ekspresyonunun 18 kat daha fazla regüle edildiği bulunmuştur (173). Travmatik beyin hasarı sonrası Bmal1 ifadesinin lentivirüsler aracılığıyla arttırılmasıyla apoptotik hücre ölümünün azaldığı, Bmal1 ifadesinin lentivirüsler ile azaltılmasıyla apoptotik hücre ölümünün arttığı DNA fragmentasyon analizi ile gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında apoptotik sinyal mekanizmalarında görev alan anti apoptotik Bcl-XL ve pro apoptotik Bax protein seviyesi değerlendirilmiştir. Bmal1 ifadesi arttırılmasıyla grupta Bcl-XL protein seviyesi artarken, Bmal1 ifadesinin azaltılmasıyla Bcl-XL protein seviyesinde azalmaktadır. Yine Bmal1 ifadesinin azaltılmasıyla Bax protein seviyesinde artma görülmüştür. TM3 Leyding hücre hattında, siRNA yoluyla inhibe edilen Bmal1'in baskılanmasının önemli derecede Bax ekspresyonunu arttırdığı, Bcl ailesinin anti apoptotik üyelerinden biri olan Bcl-2 ekspresyonunu ise azalttığı görülmüştür (144)

Beyindeki vazokonstriksiyon, vasküler oklüzyon ve kan beyin bariyerinin bozulması ile karakterize edilen mikrovasküler disfonksiyon, travmatik beyin hasarını takiben gerçekleşen mekanizmaları olumsuz etkilemektedir. Vazodilatör özelliği nedeniyle endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) tarafından üretilen nitrik oksit vasküler homeostazın anahtar düzenleyicisidir (174). Travmatik beyin hasarına bağlı olarak

artan beyin kan akımının eNOS ile ilişkisine bakıldığında Bmal1 ifadesinin artırılması eNOS protein seviyesini anlamlı bir şekilde arttırken Bmal1 protein seviyesinin azaltılması eNOS protein seviyesini istatistiksel olarak anlamlı olmasada arttırmıştır.

Subakut dönem deney seti ipsilateral korteks dokularından elde edilen verileri protein seviyesinde desteklemek için Brevican, Versican, Gap43 protein analizleri Western blot yöntemiyle incelenmiştir.

Presinaptik terminallerde, büyüme konilerinde ve yetişkin beyinde plastisitesi yüksek alanlarda bulunan Büyüme ile ilişkili protein 43 (Gap43), omurgalılarda işlevsel bir serebral korteksin gelişimi için gereklidir. Gap43'ün yokluğu, serebellar granül hücrelerinin proliferasyonunda, farklılaşmasında ve polarizasyonunda kusurlara neden olmakla birlikte Purkinje hücrelerinin hem olgunlaşmasını hem de mediolateral desenlenmesi inhibe etmektedir (175, 176). İpsilateral korteks seviyesinden yapılan analizlerde Bmal1 ifadesi arttırılmasıyla Gap43 (43kDa) protein ifadesi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalırken Gap43 (38kDa) protein ifadesi artmaktadır. Bmal1 ifadesinin azaltılmasıyla Gap43 (43kDa ve 38kDa) protein ifadesi azalmaktadır.

Brevican, beyindeki çok sayıda fizyolojik ve patofizyolojik plastisite sürecinde yer alan bir nöral proteoglikandır (177). Brevican, beyin hasarının denyesel modellerinde, korteks lezyonları gibi çeşitli yaralanmalarda artan bir ekspresyon sergilemektedir (178, 179). Travma sonrası subakut dönemde hem Bmal1 ifadesinin arttırılmasıyla Brevican protein ifadesinde bir azalma gözlelenmiştir. Bunun yanı sıra Bmal1 protein ifadesi baskılanmış gruplarda da Brevican protein ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir.

Akson yaralanması, travmatik beyin hasarının önemli bir özelliğidir. Akson onarımını güçlendirmeye yönelik tedavilerin potansiyel olarak fonksiyonel sonuçları iyileştirebileceği öngörülmektedir. Potansiyel bir hedef olarak merkezi sinir sistemi hasarlarından sonra genellikle yukarı regüle olan kondroitin sülfat proteoglianlardır (180). Kondroitin sülfat/dermatan sülfat proteoglikan ailesi üyelerinden biri olan Versican, beyinin ve büyük kan damarlarındaki hücre dışı matriksin yapısal makro molekülü olarak hizmet eder. Versican patolojik koşullar altında yüksek seviyelerde

geçici olarak ifade edilmektedir (181). Travmatik beyin hasarından 4 ve 14 gün sonra Versican mRNA' sında önemli artış olduğu bilinmektedir (180). Tez çalışmasında beklendiği gibi Bmal1 ifadesi arttırılmasıyla Versican protein seviyesi anlamlı bir şekilde azalmaktadır. İlginç olarak Bmal1 ifadesinin azaltılmasıyla anlamlı olmasa da Versican protein seviyesinde az da olsa azalma olduğu görülmüştür.

Literatürde yapılan araştırmalar, travmatik beyin hasarı patofizyolojisinin çoklu nöroanatomik ağlarda, nörotransmitter sistemlerinde fonksiyonel veya yapısal hasarı içeren oldukça kapsamlı bir mekanizmaya sahip olduğunu söylemektedir. Fizyolojik yaralanma için bu geniş kapsamlı potansiyel, travmatik beyin hasarını takiben nörodavranışsal ve nörobilişsel semptomların çeşitliliğine yansımaktadır (182). Nörodavranışsal semptomlar ve bozukluklar, travma sonrası ilk yıl ortaya çıkmaktadır. Travmatik yaralanma nedeniyle başvuran bireylerin %31'inde yaralanmadan sonraki ilk yıl içinde psikiyatrik hastalık teşhisi konulmuştur (183, 184). Travma sonrası depresyonun, lokomotor aktivitenin, motor koordinasyonun belirlenebilmesi için subakut dönemde 3.,14., 28., 35. günlerde rotarod motor koordinasyon testi, açık alan testi, kuyruktan asma testi yapılmıştır. İlk davranış testleri travmatik beyin hasarından 3 gün önce taban çizgi (baseline) oluşturması amacıyla yapılmıştır. Travma sonrası fonksiyonel iyileşmenin ve motor koordinasyonun ölçülebilmesi için rotarod testi yapılmıştır ve zamana bağlı olarak gruplardaki değişimler değerlendirilmiştir. Normal fizyolojik koşullar altında alınan ölçümlerde farelerin yaklaşık olarak 300 s süresince rotarod platformu üzerinde kalabildiği gösterilmiştir. Beyin felci operasyonlarından sonra 3. günde yapılan testte ise tüm grupların travmadan dolayı motor koordinasyonlarında düşüş gözlemlenmiştir. Kuyruktan asma testi, potansiyel antidepresan ilaçların taranmasında ve depresyonla ilgili davranışları etkilmesi beklenen diğer araştırma konularının değerlendirilmesinde kullanılan bir fare davranış testidir. Travmatik beyin hasarından sonra depresyon yaygındır ve ilk altı ay içerisinde her beş hastadan en az biri majör depresif epizod kriterlerini taşır (184-186). Bmal1'in travmatik beyin hasarı sonrası depresyon üzerine olan etkisi kuyruktan asma testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Travmatik beyin hasarının indüklenmesinden sonra farelerin hareketli oldukları süre travma öncesine göre azalmış olup daha fazla hareketsiz kalmışlardır. Gruplar karşılaştırıldığında grupların benze eğilim izlediği ve aralarında istatistiksel bir anlamlılığın olmadığı tespit

edilmiştir. Yapılan bir çalışmada ön beyin bölgesinde Bmal1'den yoksun farelerde, Bmal1 kaybının kuyruktan asma testindeki performansını değiştirmediğini gösterilmiştir (187). Açık alan testi, farelerde lokomotor aktivite, hareket, anksiyete gibi davranışları analiz etmek için; yeni ilaç hedeflerin nörobiyolojik temeline ilişkin çalışmalarda kullanılmaktadır (188, 189). Bmal1'in lokomotor aktivite üzerine olan etkisi açık alan testi ile değerlendirilmiş ve travma sonra farelerin hareketsiz kaldıkları srenin travma öncesine göre arttığı gözlemlenmiştir. 35. günde Lv-GFP grubuna göre Lv-Bmal1 grubuna göre hareketlilik sresinde artış gözlemlenirken scrRNA grubuna göre sh-Bmal1 grubu hareketlilik sresinde azalma olduğu bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.



## 8. SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen veriler bir bütün olarak incelendiğinde lentivirüsler aracılığıyla Bmal1 ifadesinin arttırılmış ve azaltılmıştır. Bmal1 ifadesinin arttırılmasıyla akut dönem travmatik beyin hasarı sonrası hasar hacmi, beyin ödemi ve apoptotik hücre sayısı azaltılmaktadır; nöronal sağkalım artmaktadır. Bmal1'in lentiviral vektörler aracılığıyla ifadesinin azaltılması akut dönem travma sonrası hasar hacmini, beyin ödemi ve DNA fragmantasyonunu arttırmakta; nöronal sağkalımı ise azaltmaktadır. Subakut dönem davranış çalışmalarıyla Bmal1'in, motor koordinasyon ve depresyon üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı, lokomotor aktiviteyi 35. günde hareketlilik süresini arttırdığı gösterilmiştir. Akut ve subakut dönemlerde yapılan geniş ölçekli protein analizleri ile travma sonrası Bmal1'e bağlı olarak hücresel sinyal yollarında meydana gelen protein ifade değişimleri detaylı olarak araştırılmıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında Bmal1'in akut ve subakut dönem travmatik beyin hasarında rolünün incelenmesi hedeflenmiştir. Akut ve subakut döneme bağlı olarak travmaya bağlı olarak hasara etki eden mekanizmaların araştırılmasıyla birlikte çalışmada elde edilen bilgilerle Bmal1'in travma sonrası mekanizmalarda görev aldığı; Bmal1, travmatik beyin hasarını takiben ikincil hasar mekanizmaları için umut verici terapötik bir hedef olabileceği düşünülmektedir.

## 9. KAYNAKLAR

1. Bruns, J, Jr., and Hauser, WA. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia* **44**, 2-10. (2003).
2. Dewan, MC, Rattani, A, Gupta, S, Baticulon, RE, Hung, YC, Punchak, M, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *Journal of neurosurgery*, 1-18. (2018).
3. Maas, AIR, Menon, DK, Adelson, PD, Andelic, N, Bell, MJ, Belli, A, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *The Lancet. Neurology* **16**, 987-1048. (2017).
4. 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-kappaB pathways in traumatic brain injury in mice. *Molecular biology reports* **46**, 241-250. (2019).
5. Bazarian, JJ, Cernak, I, Noble-Haesslein, L, Potolicchio, S, and Temkin, N. Long-term neurologic outcomes after traumatic brain injury. *The Journal of head trauma rehabilitation* **24**, 439-451. (2009).
6. Zaloshnja, E, Miller, T, Langlois, JA, and Selassie, AW. Prevalence of long-term disability from traumatic brain injury in the civilian population of the United States, 2005. *The Journal of head trauma rehabilitation* **23**, 394-400. (2008).
7. Ng, SY, and Lee, AYW. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in cellular neuroscience* **13**, 528. (2019).
8. Pantazopoulos, H, Gamble, K, Stork, O, and Amir, S. Circadian Rhythms in Regulation of Brain Processes and Role in Psychiatric Disorders. *Neural plasticity* **2018**, 5892657. (2018).
9. Shimba, S, Ishii, N, Ohta, Y, Ohno, T, Watabe, Y, Hayashi, M, et al. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 12071-12076. (2005).
10. Sahar, S, and Sassone-Corsi, P. Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nature reviews. Cancer* **9**, 886-896. (2009).
11. Bunger, MK, Walisser, JA, Sullivan, R, Manley, PA, Moran, SM, Kalschur, VL, et al. Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the Mop3/Bmal-1 locus. *Genesis* **41**, 122-132. (2005).
12. Bunger, MK, Wilsbacher, LD, Moran, SM, Clendenin, C, Radcliffe, LA, Hogenesch, JB, et al. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* **103**, 1009-1017. (2000).
13. Rudic, RD, McNamara, P, Curtis, AM, Boston, RC, Panda, S, Hogenesch, JB, et al. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS biology* **2**, e377. (2004).
14. Gu, Z, Wang, B, Zhang, YB, Ding, H, Zhang, Y, Yu, J, et al. Association of ARNTL and PER1 genes with Parkinson's disease: a case-control study of Han Chinese. *Scientific reports* **5**, 15891. (2015).
15. Hood, S, and Amir, S. Neurodegeneration and the Circadian Clock. *Frontiers in aging neuroscience* **9**, 170. (2017).



16. Kondratov, RV, Kondratova, AA, Gorbacheva, VY, Vykhovanets, OV, and Antoch, MP. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes & development* **20**, 1868-1873. (2006).
17. Musiek, ES, Lim, MM, Yang, G, Bauer, AQ, Qi, L, Lee, Y, et al. Circadian clock proteins regulate neuronal redox homeostasis and neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation* **123**, 5389-5400. (2013).
18. 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. *Molecular neurobiology* **55**, 2565-2576. (2018).
19. Andriessen, TM, Jacobs, B, and Vos, PE. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *Journal of cellular and molecular medicine* **14**, 2381-2392. (2010).
20. Black, KL, Hanks, RA, Wood, DL, Zafonte, RD, Cullen, N, Cifu, DX, et al. Blunt versus penetrating violent traumatic brain injury: frequency and factors associated with secondary conditions and complications. *The Journal of head trauma rehabilitation* **17**, 489-496. (2002).
21. Loane, DJ, and Faden, AI. Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies. *Trends in pharmacological sciences* **31**, 596-604. (2010).
22. Park, E, Bell, JD, and Baker, AJ. Traumatic brain injury: can the consequences be stopped? *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **178**, 1163-1170. (2008).
23. Skandsen, T, Kvistad, KA, Solheim, O, Strand, IH, Folvik, M, and Vik, A. Prevalence and impact of diffuse axonal injury in patients with moderate and severe head injury: a cohort study of early magnetic resonance imaging findings and 1-year outcome. *Journal of neurosurgery* **113**, 556-563. (2010).
24. Ray, SK, Dixon, CE, and Banik, NL. Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Histology and histopathology* **17**, 1137-1152. (2002).
25. Chamoun, R, Suki, D, Gopinath, SP, Goodman, JC, and Robertson, C. Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury. *Journal of neurosurgery* **113**, 564-570. (2010).
26. Faden, AI, Demediuk, P, Panter, SS, and Vink, R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* **244**, 798-800. (1989).
27. Meldrum, BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of nutrition* **130**, 1007S-1015S. (2000).
28. Folkerts, MM, Parks, EA, Dedman, JR, Kaetzel, MA, Lyeth, BG, and Berman, RF. Phosphorylation of calcium calmodulin-dependent protein kinase II following lateral fluid percussion brain injury in rats. *Journal of neurotrauma* **24**, 638-650. (2007).
29. Lu, KT, Cheng, NC, Wu, CY, and Yang, YL. NKCC1-mediated traumatic brain injury-induced brain edema and neuron death via Raf/MEK/MAPK cascade. *Critical care medicine* **36**, 917-922. (2008).
30. Girouard, H, Wang, G, Gallo, EF, Anrather, J, Zhou, P, Pickel, VM, et al. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric

- oxide and NOX2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 2545-2552. (2009).
31. Sattler, R, Xiong, Z, Lu, WY, Hafner, M, MacDonald, JF, and Tymianski, M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* **284**, 1845-1848. (1999).
  32. Weber, JT. Altered calcium signaling following traumatic brain injury. *Frontiers in pharmacology* **3**, 60. (2012).
  33. Deshpande, LS, Sun, DA, Sombati, S, Baranova, A, Wilson, MS, Attkisson, E, et al. Alterations in neuronal calcium levels are associated with cognitive deficits after traumatic brain injury. *Neuroscience letters* **441**, 115-119. (2008).
  34. Lifshitz, J, Sullivan, PG, Hovda, DA, Wieloch, T, and McIntosh, TK. Mitochondrial damage and dysfunction in traumatic brain injury. *Mitochondrion* **4**, 705-713. (2004).
  35. Singh, IN, Sullivan, PG, Deng, Y, Mbye, LH, and Hall, ED. Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **26**, 1407-1418. (2006).
  36. Sullivan, PG, Keller, JN, Bussen, WL, and Scheff, SW. Cytochrome c release and caspase activation after traumatic brain injury. *Brain research* **949**, 88-96. (2002).
  37. Xiong, Y, Gu, Q, Peterson, PL, Muizelaar, JP, and Lee, CP. Mitochondrial dysfunction and calcium perturbation induced by traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma* **14**, 23-34. (1997).
  38. Cornelius, C, Crupi, R, Calabrese, V, Graziano, A, Milone, P, Pennisi, G, et al. Traumatic brain injury: oxidative stress and neuroprotection. *Antioxidants & redox signaling* **19**, 836-853. (2013).
  39. Hall, ED, Detloff, MR, Johnson, K, and Kupina, NC. Peroxynitrite-mediated protein nitration and lipid peroxidation in a mouse model of traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma* **21**, 9-20. (2004).
  40. Ansari, MA, Roberts, KN, and Scheff, SW. Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free radical biology & medicine* **45**, 443-452. (2008).
  41. Pratico, D, Reiss, P, Tang, LX, Sung, S, Rokach, J, and McIntosh, TK. Local and systemic increase in lipid peroxidation after moderate experimental traumatic brain injury. *Journal of neurochemistry* **80**, 894-898. (2002).
  42. Chodobski, A, Zink, BJ, and Szymdynger-Chodobska, J. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Translational stroke research* **2**, 492-516. (2011).
  43. Lotocki, G, de Rivero Vaccari, JP, Perez, ER, Sanchez-Molano, J, Furones-Alonso, O, Bramlett, HM, et al. Alterations in blood-brain barrier permeability to large and small molecules and leukocyte accumulation after traumatic brain injury: effects of post-traumatic hypothermia. *Journal of neurotrauma* **26**, 1123-1134. (2009).
  44. Tajiri, N, Hernandez, D, Acosta, S, Shinozuka, K, Ishikawa, H, Ehrhart, J, et al. Suppressed cytokine expression immediately following traumatic brain

- injury in neonatal rats indicates an expeditious endogenous anti-inflammatory response. *Brain research* **1559**, 65-71. (2014).
45. Schmidt, OI, Heyde, CE, Ertel, W, and Stahel, PF. Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain research. Brain research reviews* **48**, 388-399. (2005).
  46. Bellander, BM, Singhrao, SK, Ohlsson, M, Mattsson, P, and Svensson, M. Complement activation in the human brain after traumatic head injury. *Journal of neurotrauma* **18**, 1295-1311. (2001).
  47. Fluiter, K, Opperhuizen, AL, Morgan, BP, Baas, F, and 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. *Journal of immunology* **192**, 2339-2348. (2014).
  48. Kumar, A, and Loane, DJ. Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain, behavior, and immunity* **26**, 1191-1201. (2012).
  49. Hernandez-Ontiveros, DG, Tajiri, N, Acosta, S, Giunta, B, Tan, J, and Borlongan, CV. Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Frontiers in neurology* **4**, 30. (2013).
  50. Kabadi, SV, and Faden, AI. Neuroprotective strategies for traumatic brain injury: improving clinical translation. *International journal of molecular sciences* **15**, 1216-1236. (2014).
  51. Yu, F, Wang, Z, Tanaka, M, Chiu, CT, Leeds, P, Zhang, Y, et al. Posttrauma cotreatment with lithium and valproate: reduction of lesion volume, attenuation of blood-brain barrier disruption, and improvement in motor coordination in mice with traumatic brain injury. *Journal of neurosurgery* **119**, 766-773. (2013).
  52. Ransohoff, RM. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *The Journal of infectious diseases* **186 Suppl 2**, S152-156. (2002).
  53. Wu, LY, Bao, XQ, Sun, H, and Zhang, D. Scavenger receptor on astrocytes and its relationship with neuroinflammation. *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae* **36**, 330-335. (2014).
  54. Zhao, Z, Alam, S, Oppenheim, RW, Prevette, DM, Evenson, A, and Parsadanian, A. Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the CNS rescues motoneurons from programmed cell death and promotes their long-term survival following axotomy. *Experimental neurology* **190**, 356-372. (2004).
  55. Beer, R, Franz, G, Srinivasan, A, Hayes, RL, Pike, BR, Newcomb, JK, et al. Temporal profile and cell subtype distribution of activated caspase-3 following experimental traumatic brain injury. *Journal of neurochemistry* **75**, 1264-1273. (2000).
  56. Smith, DH, Chen, XH, Pierce, JE, Wolf, JA, Trojanowski, JQ, Graham, DI, et al. Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat. *Journal of neurotrauma* **14**, 715-727. (1997).
  57. Grady, MS, Charleston, JS, Maris, D, Witgen, BM, and Lifshitz, J. Neuronal and glial cell number in the hippocampus after experimental traumatic brain injury: analysis by stereological estimation. *Journal of neurotrauma* **20**, 929-941. (2003).

58. Kawasaki, H, Morooka, T, Shimohama, S, Kimura, J, Hirano, T, Gotoh, Y, et al. Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *The Journal of biological chemistry* **272**, 18518-18521. (1997).
59. Mori, T, Wang, X, Jung, JC, Sumii, T, Singhal, AB, Fini, ME, et al. Mitogen-activated protein kinase inhibition in traumatic brain injury: in vitro and in vivo effects. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **22**, 444-452. (2002).
60. Raghupathi, R. Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain pathology* **14**, 215-222. (2004).
61. Zhao, JB, Zhang, Y, Li, GZ, Su, XF, and Hang, CH. Activation of JAK2/STAT pathway in cerebral cortex after experimental traumatic brain injury of rats. *Neuroscience letters* **498**, 147-152. (2011).
62. Wollnik, F. Physiology and regulation of biological rhythms in laboratory animals: an overview. *Laboratory animals* **23**, 107-125. (1989).
63. Lemmer, B. Discoveries of rhythms in human biological functions: a historical review. *Chronobiology international* **26**, 1019-1068. (2009).
64. Halberg, P. Thyro-Cytotoxic Factor. Preliminary Report. *Acta medica Scandinavica* **177**, 127-128. (1965).
65. Halberg, F, Engeli, M, Hamburger, C, and Hillman, D. Spectral resolution of low-frequency, small-amplitude rhythms in excreted 17-ketosteroids; probable androgen-induced circaseptan desynchronization. *Acta endocrinologica* **50**, Suppl 103:101-154. (1965).
66. Riess, P, Bareyre, FM, Saatman, KE, Cheney, JA, Lifshitz, J, Raghupathi, R, et al. Effects of chronic, post-injury Cyclosporin A administration on motor and sensorimotor function following severe, experimental traumatic brain injury. *Restorative neurology and neuroscience* **18**, 1-8. (2001).
67. Mahesh, VB. The dynamic interaction between steroids and gonadotropins in the mammalian ovulatory cycle. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **9**, 245-260. (1985).
68. Gwinner, E. Circannual rhythms in birds. *Current opinion in neurobiology* **13**, 770-778. (2003).
69. Kondo, N, Sekijima, T, Kondo, J, Takamatsu, N, Tohya, K, and Ohtsu, T. Circannual control of hibernation by HP complex in the brain. *Cell* **125**, 161-172. (2006).
70. Lincoln, GA, Andersson, H, and Loudon, A. Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals--a unifying hypothesis. *The Journal of endocrinology* **179**, 1-13. (2003).
71. Miyazaki, Y, Nisimura, T, and Numata, H. A phase response curve for circannual rhythm in the varied carpet beetle *Anthrenus verbasci*. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* **191**, 883-887. (2005).
72. Finger, AM, and Kramer, A. Mammalian circadian systems: Organization and modern life challenges. *Acta physiologica* **231**, e13548. (2021).
73. Ko, CH, and Takahashi, JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human molecular genetics* **15 Spec No 2**, R271-277. (2006).

74. Kwon, I, Choe, HK, Son, GH, and Kim, K. Mammalian molecular clocks. *Experimental neurobiology* **20**, 18-28. (2011).
75. Storch, KF, Lipan, O, Leykin, I, Viswanathan, N, Davis, FC, Wong, WH, et al. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* **417**, 78-83. (2002).
76. Yamazaki, S, Numano, R, Abe, M, Hida, A, Takahashi, R, Ueda, M, et al. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**, 682-685. (2000).
77. Guldner, FH. Numbers of neurons and astroglial cells in the suprachiasmatic nucleus of male and female rats. *Experimental brain research* **50**, 373-376. (1983).
78. Hofman, MA, Fliers, E, Goudsmit, E, and Swaab, DF. Morphometric analysis of the suprachiasmatic and paraventricular nuclei in the human brain: sex differences and age-dependent changes. *Journal of anatomy* **160**, 127-143. (1988).
79. Swaab, DF, Fliers, E, and Partiman, TS. The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and senile dementia. *Brain research* **342**, 37-44. (1985).
80. Van den Pol, AN. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *The Journal of comparative neurology* **191**, 661-702. (1980).
81. Yoo, SH, Yamazaki, S, Lowrey, PL, Shimomura, K, Ko, CH, Buhr, ED, et al. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 5339-5346. (2004).
82. Gooley, JJ, Lu, J, Chou, TC, Scammell, TE, and Saper, CB. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nature neuroscience* **4**, 1165. (2001).
83. Hattar, S, Liao, HW, Takao, M, Berson, DM, and Yau, KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* **295**, 1065-1070. (2002).
84. Moore, RY. Retinohypothalamic projection in mammals: a comparative study. *Brain research* **49**, 403-409. (1973).
85. Moore, RY, and Lenn, NJ. A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of comparative neurology* **146**, 1-14. (1972).
86. Moore, RY, Speh, JC, and Card, JP. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *The Journal of comparative neurology* **352**, 351-366. (1995).
87. Schibler, U, and Sassone-Corsi, P. A web of circadian pacemakers. *Cell* **111**, 919-922. (2002).
88. Lowrey, PL, and Takahashi, JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annual review of genomics and human genetics* **5**, 407-441. (2004).
89. Takahashi, JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature reviews. Genetics* **18**, 164-179. (2017).
90. Aryal, RP, Kwak, PB, Tamayo, AG, Gebert, M, Chiu, PL, Walz, T, et al. Macromolecular Assemblies of the Mammalian Circadian Clock. *Molecular cell* **67**, 770-782 e776. (2017).

91. Partch, CL. Orchestration of Circadian Timing by Macromolecular Protein Assemblies. *Journal of molecular biology* **432**, 3426-3448. (2020).
92. Akashi, M, Tsuchiya, Y, Yoshino, T, and Nishida, E. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Molecular and cellular biology* **22**, 1693-1703. (2002).
93. Eide, EJ, Vielhaber, EL, Hinz, WA, and Virshup, DM. The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. *The Journal of biological chemistry* **277**, 17248-17254. (2002).
94. Lowrey, PL, Shimomura, K, Antoch, MP, Yamazaki, S, Zemenides, PD, Ralph, MR, et al. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* **288**, 483-492. (2000).
95. Xu, Y, Padiath, QS, Shapiro, RE, Jones, CR, Wu, SC, Saigoh, N, et al. Functional consequences of a CKIdelta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* **434**, 640-644. (2005).
96. Etchegaray, JP, Machida, KK, Noton, E, Constance, CM, Dallmann, R, Di Napoli, MN, et al. Casein kinase 1 delta regulates the pace of the mammalian circadian clock. *Molecular and cellular biology* **29**, 3853-3866. (2009).
97. Lee, HM, Chen, R, Kim, H, Etchegaray, JP, Weaver, DR, and Lee, C. The period of the circadian oscillator is primarily determined by the balance between casein kinase 1 and protein phosphatase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 16451-16456. (2011).
98. Akashi, M, and Takumi, T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nature structural & molecular biology* **12**, 441-448. (2005).
99. Guillaumond, F, Dardente, H, Giguere, V, and Cermakian, N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *Journal of biological rhythms* **20**, 391-403. (2005).
100. Preitner, N, Damiola, F, Lopez-Molina, L, Zakany, J, Duboule, D, Albrecht, U, et al. The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* **110**, 251-260. (2002).
101. Sato, TK, Panda, S, Miraglia, LJ, Reyes, TM, Rudic, RD, McNamara, P, et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* **43**, 527-537. (2004).
102. Triqueneaux, G, Thenot, S, Kakizawa, T, Antoch, MP, Safi, R, Takahashi, JS, et al. The orphan receptor Rev-erbalpha gene is a target of the circadian clock pacemaker. *Journal of molecular endocrinology* **33**, 585-608. (2004).
103. Mitsui, S, Yamaguchi, S, Matsuo, T, Ishida, Y, and Okamura, H. Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes & development* **15**, 995-1006. (2001).
104. Ueda, HR, Hayashi, S, Chen, W, Sano, M, Machida, M, Shigeyoshi, Y, et al. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nature genetics* **37**, 187-192. (2005).
105. Kewley, RJ, Whitelaw, ML, and Chapman-Smith, A. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**, 189-204. (2004).

106. Gu, YZ, Hogenesch, JB, and Bradfield, CA. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annual review of pharmacology and toxicology* **40**, 519-561. (2000).
107. Hogenesch, JB, Gu, YZ, Jain, S, and Bradfield, CA. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5474-5479. (1998).
108. Hatanaka, F, Matsubara, C, Myung, J, Yoritaka, T, Kamimura, N, Tsutsumi, S, et al. Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals a strict relationship with metabolism. *Molecular and cellular biology* **30**, 5636-5648. (2010).
109. Laposky, A, Easton, A, Dugovic, C, Walisser, J, Bradfield, C, and Turek, F. Deletion of the mammalian circadian clock gene BMAL1/Mop3 alters baseline sleep architecture and the response to sleep deprivation. *Sleep* **28**, 395-409. (2005).
110. Lamia, KA, Storch, KF, and Weitz, CJ. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15172-15177. (2008).
111. Lee, J, Kim, MS, Li, R, Liu, VY, Fu, L, Moore, DD, et al. Loss of Bmal1 leads to uncoupling and impaired glucose-stimulated insulin secretion in beta-cells. *Islets* **3**, 381-388. (2011).
112. Marcheva, B, Ramsey, KM, Buhr, ED, Kobayashi, Y, Su, H, Ko, CH, et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* **466**, 627-631. (2010).
113. Curtis, AM, Cheng, Y, Kapoor, S, Reilly, D, Price, TS, and Fitzgerald, GA. Circadian variation of blood pressure and the vascular response to asynchronous stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 3450-3455. (2007).
114. Schroder, EA, Lefta, M, Zhang, X, Bartos, DC, Feng, HZ, Zhao, Y, et al. The cardiomyocyte molecular clock, regulation of Scn5a, and arrhythmia susceptibility. *American journal of physiology. Cell physiology* **304**, C954-965. (2013).
115. Young, ME, Brewer, RA, Pelicieri-Garcia, RA, Collins, HE, He, L, Birky, TL, et al. Cardiomyocyte-specific BMAL1 plays critical roles in metabolism, signaling, and maintenance of contractile function of the heart. *Journal of biological rhythms* **29**, 257-276. (2014).
116. Chen, Q, Peng, XD, Huang, CQ, Hu, XY, and Zhang, XM. Association between ARNTL (BMAL1) rs2278749 polymorphism T >C and susceptibility to Alzheimer disease in a Chinese population. *Genetics and molecular research : GMR* **14**, 18515-18522. (2015).
117. Cai, Y, Liu, S, Sothorn, RB, Xu, S, and Chan, P. Expression of clock genes Per1 and Bmal1 in total leukocytes in health and Parkinson's disease. *European journal of neurology* **17**, 550-554. (2010).
118. Kondratov, RV, Vykhovanets, O, Kondratova, AA, and Antoch, MP. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine ameliorates symptoms of premature aging associated with the deficiency of the circadian protein BMAL1. *Aging* **1**, 979-987. (2009).

119. Lee, J, Moulik, M, Fang, Z, Saha, P, Zou, F, Xu, Y, et al. Bmal1 and beta-cell clock are required for adaptation to circadian disruption, and their loss of function leads to oxidative stress-induced beta-cell failure in mice. *Molecular and cellular biology* **33**, 2327-2338. (2013).
120. Mittal, M, Siddiqui, MR, Tran, K, Reddy, SP, and Malik, AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & redox signaling* **20**, 1126-1167. (2014).
121. Hermann, DM, Kilic, E, Kugler, S, Isenmann, S, and Bahr, M. Adenovirus-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression protects against subsequent cortical cold injury in rats. *Neurobiology of disease* **8**, 964-973. (2001).
122. Beker, M, Caglayan, AB, Beker, MC, Altunay, S, Karacay, R, Dalay, A, et al. Lentivirally administered glial cell line-derived neurotrophic factor promotes post-ischemic neurological recovery, brain remodeling and contralesional pyramidal tract plasticity by regulating axonal growth inhibitors and guidance proteins. *Experimental neurology* **331**, 113364. (2020).
123. 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. *Behavioural brain research* **392**, 112719. (2020).
124. 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**, 56-74. (2021).
125. Cederberg, D, and Siesjo, P. What has inflammation to do with traumatic brain injury? *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* **26**, 221-226. (2010).
126. Sauerbeck, A, Gao, J, Readnower, R, Liu, M, Pauly, JR, Bing, G, et al. Pioglitazone attenuates mitochondrial dysfunction, cognitive impairment, cortical tissue loss, and inflammation following traumatic brain injury. *Experimental neurology* **227**, 128-135. (2011).
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. *Neuroscience letters* **612**, 92-97. (2016).
128. Beker, MC, Caglayan, B, Caglayan, AB, Kelestemur, T, Yalcin, E, Caglayan, A, et al. Interaction of melatonin and Bmal1 in the regulation of PI3K/AKT pathway components and cellular survival. *Scientific reports* **9**, 19082. (2019).
129. Kilic, E, Reitmeir, R, Kilic, U, 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. *Frontiers in cellular neuroscience* **8**, 422. (2014).
130. Cole, TB. Global road safety crisis remedy sought: 1.2 million killed, 50 million injured annually. *Jama* **291**, 2531-2532. (2004).
131. Najem, D, Rennie, K, Ribocco-Lutkiewicz, M, Ly, D, Haukenfrers, J, Liu, Q, et al. Traumatic brain injury: classification, models, and markers. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **96**, 391-406. (2018).



132. Reis, C, Wang, Y, Akyol, O, Ho, WM, Ii, RA, Stier, G, et al. What's New in Traumatic Brain Injury: Update on Tracking, Monitoring and Treatment. *International journal of molecular sciences* **16**, 11903-11965. (2015).
133. Norup, A, Kruse, M, Soendergaard, PL, Rasmussen, KW, and Biering-Sorensen, F. Socioeconomic Consequences of Traumatic Brain Injury: A Danish Nationwide Register-Based Study. *Journal of neurotrauma* **37**, 2694-2702. (2020).
134. Young, L, Rule, GT, Bocchieri, RT, Walilko, TJ, Burns, JM, and Ling, G. When physics meets biology: low and high-velocity penetration, blunt impact, and blast injuries to the brain. *Frontiers in neurology* **6**, 89. (2015).
135. Galgano, M, Toshkezi, G, Qiu, X, Russell, T, Chin, L, and Zhao, LR. Traumatic Brain Injury: Current Treatment Strategies and Future Endeavors. *Cell transplantation* **26**, 1118-1130. (2017).
136. McKee, AC, and Daneshvar, DH. The neuropathology of traumatic brain injury. *Handbook of clinical neurology* **127**, 45-66. (2015).
137. McGinn, MJ, and Povlishock, JT. Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Neurosurgery clinics of North America* **27**, 397-407. (2016).
138. Hudak, AM, Peng, L, Marquez de la Plata, C, Thottakara, J, Moore, C, Harper, C, et al. Cytotoxic and vasogenic cerebral oedema in traumatic brain injury: assessment with FLAIR and DWI imaging. *Brain injury* **28**, 1602-1609. (2014).
139. Winkler, EA, Minter, D, Yue, JK, and Manley, GT. Cerebral Edema in Traumatic Brain Injury: Pathophysiology and Prospective Therapeutic Targets. *Neurosurgery clinics of North America* **27**, 473-488. (2016).
140. Li, B, Li, D, Ni, H, Liu, C, Xiong, J, Liu, H, et al. The circadian clock regulator Bmal1 affects traumatic brain injury in rats through the p38 MAPK signalling pathway. *Brain research bulletin* **178**, 17-28. (2022).
141. Gong, Y, Zhang, G, Li, B, Cao, C, Cao, D, Li, X, et al. BMAL1 attenuates intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury in rats by regulating the Nrf2 signaling pathway. *Annals of translational medicine* **9**, 1617. (2021).
142. Gavrieli, Y, Sherman, Y, and Ben-Sasson, SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* **119**, 493-501. (1992).
143. Akamatsu, Y, and Hanafy, KA. Cell Death and Recovery in Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **17**, 446-456. (2020).
144. Ding, H, Zhao, J, Liu, H, Wang, J, and Lu, W. BMAL1 knockdown promoted apoptosis and reduced testosterone secretion in TM3 Leydig cell line. *Gene* **747**, 144672. (2020).
145. Barca-Mayo, O, Boender, AJ, Armirotti, A, and De Pietri Tonelli, D. Deletion of astrocytic BMAL1 results in metabolic imbalance and shorter lifespan in mice. *Glia* **68**, 1131-1147. (2020).
146. Long, HZ, Cheng, Y, Zhou, ZW, Luo, HY, Wen, DD, and Gao, LC. PI3K/AKT Signal Pathway: A Target of Natural Products in the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Frontiers in pharmacology* **12**, 648636. (2021).

147. Matsuda, S, Ikeda, Y, Murakami, M, Nakagawa, Y, Tsuji, A, and Kitagishi, Y. Roles of PI3K/AKT/GSK3 Pathway Involved in Psychiatric Illnesses. *Diseases* **7**(2019).
148. Rai, SN, Dilmashin, H, Birla, H, Singh, SS, Zahra, W, Rathore, AS, et al. The Role of PI3K/Akt and ERK in Neurodegenerative Disorders. *Neurotoxicity research* **35**, 775-795. (2019).
149. Brunet, A, Bonni, A, Zigmond, MJ, Lin, MZ, Juo, P, Hu, LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868. (1999).
150. Cardone, MH, Roy, N, Stennicke, HR, Salvesen, GS, Franke, TF, Stanbridge, E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**, 1318-1321. (1998).
151. Cross, DA, Alessi, DR, Cohen, P, Andjelkovich, M, and Hemmings, BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-789. (1995).
152. Datta, SR, Dudek, H, Tao, X, Masters, S, Fu, H, Gotoh, Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-241. (1997).
153. del Peso, L, Gonzalez-Garcia, M, Page, C, Herrera, R, and Nunez, G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**, 687-689. (1997).
154. Kops, GJ, and Burgering, BM. Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *Journal of molecular medicine* **77**, 656-665. (1999).
155. Srivastava, AK, and Pandey, SK. Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. *Molecular and cellular biochemistry* **182**, 135-141. (1998).
156. Noshita, N, Lewen, A, Sugawara, T, and Chan, PH. Akt phosphorylation and neuronal survival after traumatic brain injury in mice. *Neurobiology of disease* **9**, 294-304. (2002).
157. Aviram, R, Dandavate, V, Manella, G, Golik, M, and Asher, G. Ultradian rhythms of AKT phosphorylation and gene expression emerge in the absence of the circadian clock components Per1 and Per2. *PLoS biology* **19**, e3001492. (2021).
158. Chen, Y, Zhu, D, Yuan, J, Han, Z, Wang, Y, Qian, Z, et al. CLOCK-BMAL1 regulate the cardiac L-type calcium channel subunit CACNA1C through PI3K-Akt signaling pathway. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **94**, 1023-1032. (2016).
159. Safa, A, Abak, A, Shoorei, H, Taheri, M, and Ghafouri-Fard, S. MicroRNAs as regulators of ERK/MAPK pathway: A comprehensive review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **132**, 110853. (2020).
160. Chen, G, Zhao, H, Ma, S, Chen, L, Wu, G, Zhu, Y, et al. Circadian Rhythm Protein Bmal1 Modulates Cartilage Gene Expression in Temporomandibular Joint Osteoarthritis via the MAPK/ERK Pathway. *Frontiers in pharmacology* **11**, 527744. (2020).
161. de Los Reyes Corrales, T, Losada-Perez, M, and Casas-Tinto, S. JNK Pathway in CNS Pathologies. *International journal of molecular sciences* **22**(2021).

162. Antoniou, X, and Borsello, T. The JNK signalling transduction pathway in the brain. *Frontiers in bioscience* **4**, 2110-2120. (2012).
163. Yamasaki, T, Kawasaki, H, and Nishina, H. Diverse Roles of JNK and MKK Pathways in the Brain. *Journal of signal transduction* **2012**, 459265. (2012).
164. Zhang, W, and Liu, HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell research* **12**, 9-18. (2002).
165. Zhao, S, Fu, J, Liu, X, Wang, T, Zhang, J, and Zhao, Y. Activation of Akt/GSK-3beta/beta-catenin signaling pathway is involved in survival of neurons after traumatic brain injury in rats. *Neurological research* **34**, 400-407. (2012).
166. O'Dell, DM, Raghupathi, R, Crino, PB, Eberwine, JH, and McIntosh, TK. Traumatic brain injury alters the molecular fingerprint of TUNEL-positive cortical neurons In vivo: A single-cell analysis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 4821-4828. (2000).
167. Smith, FM, Raghupathi, R, MacKinnon, MA, McIntosh, TK, Saatman, KE, Meaney, DF, et al. TUNEL-positive staining of surface contusions after fatal head injury in man. *Acta neuropathologica* **100**, 537-545. (2000).
168. Raghupathi, R, Graham, DI, and McIntosh, TK. Apoptosis after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma* **17**, 927-938. (2000).
169. Li, M, Wang, D, He, J, Chen, L, and Li, H. Bcl-XL: A multifunctional anti-apoptotic protein. *Pharmacological research* **151**, 104547. (2020).
170. Park, HA, Broman, K, Stumpf, A, Kazyak, S, and Jonas, EA. Nutritional Regulators of Bcl-xL in the Brain. *Molecules* **23**(2018).
171. Pang, AL, Xiong, LL, Xia, QJ, Liu, F, Wang, YC, Liu, F, et al. Neural Stem Cell Transplantation Is Associated with Inhibition of Apoptosis, Bcl-xL Upregulation, and Recovery of Neurological Function in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Cell transplantation* **26**, 1262-1275. (2017).
172. Oltvai, ZN, Milliman, CL, and Korsmeyer, SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619. (1993).
173. Nathoo, N, Narotam, PK, Agrawal, DK, Connolly, CA, van Dellen, JR, Barnett, GH, et al. Influence of apoptosis on neurological outcome following traumatic cerebral contusion. *Journal of neurosurgery* **101**, 233-240. (2004).
174. Lundblad, C, Grande, PO, and Bentzer, P. Hemodynamic and histological effects of traumatic brain injury in eNOS-deficient mice. *Journal of neurotrauma* **26**, 1953-1962. (2009).
175. Biewenga, JE, Schrama, LH, and Gispen, WH. Presynaptic phosphoprotein B-50/GAP-43 in neuronal and synaptic plasticity. *Acta biochimica Polonica* **43**, 327-338. (1996).
176. Shen, Y, Mishra, R, Mani, S, and Meiri, KF. Both cell-autonomous and cell non-autonomous functions of GAP-43 are required for normal patterning of the cerebellum in vivo. *Cerebellum* **7**, 451-466. (2008).
177. Frischknecht, R, and Seidenbecher, CI. Brevican: a key proteoglycan in the perisynaptic extracellular matrix of the brain. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**, 1051-1054. (2012).
178. Minta, K, Portelius, E, Janelidze, S, Hansson, O, Zetterberg, H, Blennow, K, et al. Cerebrospinal Fluid Concentrations of Extracellular Matrix Proteins in

- Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **69**, 1213-1220. (2019).
179. Schafer, R, Dehn, D, Burbach, GJ, and Deller, T. Differential regulation of chondroitin sulfate proteoglycan mRNAs in the denervated rat fascia dentata after unilateral entorhinal cortex lesion. *Neuroscience letters* **439**, 61-65. (2008).
  180. Harris, NG, Carmichael, ST, Hovda, DA, and Sutton, RL. Traumatic brain injury results in disparate regions of chondroitin sulfate proteoglycan expression that are temporally limited. *Journal of neuroscience research* **87**, 2937-2950. (2009).
  181. Islam, S, and Watanabe, H. Versican: A Dynamic Regulator of the Extracellular Matrix. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **68**, 763-775. (2020).
  182. Polich, G, Iaccarino, MA, and Zafonte, R. Psychopharmacology of traumatic brain injury. *Handbook of clinical neurology* **165**, 253-267. (2019).
  183. Alway, Y, Gould, KR, Johnston, L, McKenzie, D, and Ponsford, J. A prospective examination of Axis I psychiatric disorders in the first 5 years following moderate to severe traumatic brain injury. *Psychological medicine* **46**, 1331-1341. (2016).
  184. Bryant, RA, O'Donnell, ML, Creamer, M, McFarlane, AC, Clark, CR, and Silove, D. The psychiatric sequelae of traumatic injury. *The American journal of psychiatry* **167**, 312-320. (2010).
  185. Bombardier, CH, Fann, JR, Temkin, NR, Esselman, PC, Barber, J, and Dikmen, SS. Rates of major depressive disorder and clinical outcomes following traumatic brain injury. *Jama* **303**, 1938-1945. (2010).
  186. Ouellet, MC, Beaulieu-Bonneau, S, Sirois, MJ, Savard, J, Turgeon, AF, Moore, L, et al. Depression in the First Year after Traumatic Brain Injury. *Journal of neurotrauma* **35**, 1620-1629. (2018).
  187. Snider, KH, Dziema, H, Aten, S, Loeser, J, Norona, FE, Hoyt, K, et al. Modulation of learning and memory by the targeted deletion of the circadian clock gene *Bmal1* in forebrain circuits. *Behavioural brain research* **308**, 222-235. (2016).
  188. Prut, L, and Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology* **463**, 3-33. (2003).
  189. Kraeuter, AK, Guest, PC, and Sarnyai, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods in molecular biology* **1916**, 99-103. (2019).

## 10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
**Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı**

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-772.02-E.40129  
Konu : Etik Kurulu Kararı

22/08/2020

**Sayın Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ**

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Bmal1’ in Akut ve Kronik Dönem Travmatik Beyin Hasarında Rolünün İncelenmesi” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Ek:  
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 22.08.2020 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden F51258B1X8 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz  
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
20/08/2020	50		Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

“Bmal1’ in Akut ve Kronik Dönem 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. Hanefi ÖZBEK	
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	



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
**Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı**

E-İmzalıdır

Sayı : E-38828770-772.02-65056  
Konu : Etik Kurulu Kararı

15/12/2020

**Sayın Elif SERTEL EVREN**

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 22/08/2020 tarihli 38828770-772.02-E.40129 sayı no ile onay verilen "Bmal1' in Akut ve Kronik Dönem Travmatik Beyin Hasarında Rolünün İncelenmesi" isimli çalışmanızın başlığını "Bmal1' in Akut ve Subakut Dönem Travmatik Beyin Hasarında Rolünün İncelenmesi" olarak değiştirilmesi ve proje yürütücüsü "Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ" yerine "Elif SERTEL EVREN" olarak değiştirilmesi isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Ertugrul KILIC tarafından 15.12.2020 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 1E469052XB kodu ile doğrulayabilirsiniz.

**İstanbul Medipol Üniversitesi**

Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz  
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)