

**T. C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**TRAVMATİK BEYİN HASARI (TBH)'NİN PATERAL GENOM  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**Hazırlayan**  
**Mehmet MEMİŞ**

**Danışman**  
**XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX**

**Yüksek Lisans Tezi**

**ARALIK 2021**  
**KAYSERİ**



**T. C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**TRAVMATİK BEYİN HASARI (TBH)'NİN PATERAL GENOM**  
**ÜZERİNE ETKİSİ**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**Hazırlayan**  
**Mehmet MEMİŞ**

**Danışman**  
**XXXXXXXXXXXXXXXXXX**

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri**  
**Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2021-11493 kodlu proje ile**  
**desteklenmiştir.**

**ARALIK 2021**  
**KAYSERİ**

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Mehmet MEMİŞ

İmza:

## YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

**“Travmatik Beyin Hasarı (TBH)’nın Paternal Genom Üzerine Etkisi”** adlı yüksek lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Tezi Hazırlayan**

**Mehmet MEMİŞ**

**Danışman**

XXXXXXXXXXXXXXXXXX

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı**

XXXXXXXXXXXXXXXXXX

**KABUL ONAY SAYFASI**

XXXXXXXXXXXXXXXXX danışmanlığında **Mehmet MEMİŞ** tarafından hazırlanan **“Travmatik Beyin Hasarı (TBH)’nın Paternal Genom Üzerine Etkisi”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

**30/12/2021****JÜRİ:****İmza:****Danışman:** XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXErciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı**Üye:** XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Bozok Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / ..... / .....  
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana her zaman yol gösterici olan, desteğini ve motivasyonunu her zaman hissettiğim, tecrübesinden yararlandığım, bilgisi ve ışığıyla düşüncelerimi şekillendiren sonsuz minnet ve saygı duyduğum çok değerli danışmanım Doç. Dr. Serpil TAHERİ'ye,

Hayata ve bilime bakış açısı, tutkusu, heyecanı ve bitmeyen azmiyle her zaman kendisine hayran olduğum saygıdeğer hocam XXXXXXXXXXX'a,

Emeğini ve desteğini her zaman hissettiğim, çalışmam sırasında desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocam XXXXXXXXXXXXX'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca önemli bilgi birikimleri elde ettiğim, tecrübelerinden faydalandığım XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX'a,

Laboratuvar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen değerli ekip arkadaşlarım; XXXXXXXXXXX'a,

Laboratuvar çalışmalarında deneyimlerinden her zaman yararlandığım XXXXXXXXXXX'a, hayvan çalışmalarında beni hiç yalnız bırakmayan, tecrübesinden yararlandığım XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX'e,

Yüksek lisans eğitim sürecimde bütün imkanlarıyla bana destek olan Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) çalışanlarına ve TÜRKİYE CUMHURİYETİ'NE,

Yüksek lisans eğitim sürecimde 2210-A Yurt İçi Lisansüstü Burs Programıyla beni destekleyen TUBİTAK'a,

Hayatım boyunca hep yanımda olan, emekleriyle beni bugünlere getiren, çok sevgili anneme, sevgili babama, ablama ve hayatı bir amaç için yaşayacağına inandığım kardeşim Ahmet Yesevi'ye,

İnsan insana konuşabildiğim, hayatımı güzelleştiren, adını burada yazamadığım kalbimde yeri olan herkese ve hayatımı şekillendiren her şeye teşekkür ederim.

Mehmet MEMİŞ

Aralık 2021, Kayseri

# TRAVMATİK BEYİN HASARI (TBH)'NİN PATERAL GENOM ÜZERİNE ETKİSİ

**Mehmet MEMİŞ**

**Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2021**

**Danışman: XXXXXXXXXXXXXXXXXX**

## ÖZET

Travmatik Beyin Hasarı(TBH) dünya çapında en yaygın ölüme ve sakatlığa neden olan bir halk sağlığı problemidir ve organizma için oldukça stres oluşturan bir durumdur. Bununla birlikte hafif TBH sıklıkla maruz kalınan en yaygın TBH türüdür.TBH oluşturduğu stres nedeniyle Hipotalamus–Hipofiz–Adrenal(HPA) aks aktivasyonuna ve oogeneze ve spermatogeneze sürecini kontrol eden Hipotalamus-Hipofiz–Gonadal(HPG) aksı disfonksiyonuna neden olmaktadır.

Telomerler; kromozom uçlarını erozyondan ve uçtan uca füzyondan koruyarak genomik stabilizasyonu sağlamaktadır. Maruz kalınan stresin ve HPA aks aktivasyonu nedeniyle artan kortizolün telomerler üzerindeki negatif etkisi vardır. Son çalışmalar telomer DNA'sının memeli hücrelerinde uzun kodlanmayan bir lncRNA olan Telomerik Tekrar İçeren RNA(TERRA)'nın transkribe edilerek kromozom uçlarını degradasyondan korudukları ve genom stabilizasyonu sağladıklarını göstermektedir. Literatürde TBH'nin diğer sistemler üzerine etkisini değerlendiren çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, TBH stresinin germ hücrelerinin genomunun yeniden regülasyonuna etkisi olup olmadığı ile ilgili yeterli çalışma yoktur.

Bu çalışmada mTBH fare modeli oluşturularak akut ve kronik dönemde travmaya maruz kalan farelerin sperm hücrelerinde TBH'nin; sperm üzerinde majör hasar oluşturup oluşturmadığı, telomer fonksiyonu ve genom stabilizasyonu üzerine etkisi, DNA hasar cevabında rol oynayan *Rad51*,*Exo1*,*Rb1*,*RNase H1* ve *RNase H2* genlerinin transkript seviyeleri RT-qPCR ile belirlenmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmada,TBH'nın telomer fonksiyonu, genom stabilizasyonu ve DNA hasar cevabı açısından değerlendirildiğinde sperm genomunun regülasyonunu değiştirdiği tespit edilmiştir.Tek sefer mTBH uygulamasının ardından akut ve kronik fazdaki transkript seviyesindeki değişikliklerin tekrarlayan TBH ile birlikte akut fazda telomer uzunluğunda keskin bir azalma gösterdiği ve sonrasında da kronik fazda yaşlanma ile ilişkili olan sperm telomer uzunluğunun artmasına neden olduğunu göstermektedir.TBH'na bağlı olarak telomer uzunluğu seviyesindeki değişikliklerle birlikte total ve hibrit TERRA seviyelerinin ve telomer regülasyonu ile ilgili *Rad51,Exo1,Rb1,RNase H1 ve RNase H2* genlerinin transkript seviyelerinin de anlamlı değiştiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler TBH'na tekrarlı şekilde maruz kalan başta futbol ve boks gibi spor dalları ile uğraşan kişilerin TBH'nın olası etkilerini paternal olarak yavrulara aktarma riskine sahip olduğunu göstermektedir.

**Anantar Kelimeler:** Genomik İnstabilite; Sperm; Telomer; TERRA; Travmatik Beyin Hasarı

# THE EFFECT OF TRAUMATIC BRAIN INJURY (TBI) ON THE PATERNAL GENOME

**Mehmet MEMİŞ**

**Erciyes University Gevher Nesibe Genome and Stem Cell Institute**

**Department of Molecular Biology and Genetics**

**Master Thesis, December 2021**

**Supervisor: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX**

## ABSTRACT

Traumatic Brain Injury (TBI) is a public health problem that causes the most common death and disability worldwide and is a highly stressful situation for the organism. Mild TBI is the most common type of TBI that is frequently exposed. TBI causes dysfunction of the Hypothalamus-Pituitary-Gonadal (HPG) axis and Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) axis, which control the oogenesis and spermatogenesis process.

Telomeres, provides genomic stabilization by protecting the chromosome ends from erosion and end-to-end fusion. Recent studies show that telomere DNA is transcribed into a long non-coding lncRNA, Telomeric Repeat Containing RNA (TERRA), in mammalian cells, protecting the chromosome ends from degradation and providing genome stabilization. Although there are studies evaluating the effect of TBI on other systems in the literature, there are not enough studies on whether TBI stress has an effect on the re-regulation of the genome of germ cells.

In this study, was determined that TBI in the sperm cells of mice exposed to trauma in the acute and chronic periods; the transcript levels of *Rad51*, *Exo1*, *Rb1*, *RNase H1* and *RNase H2* genes, which play a role in DNA damage response, telomere length and TERRA transcript levels were determined by RT-qPCR.

We found that TBI has an effect on the sperm genome in telomere function, genome stabilization and DNA damage response. It shows that the increase in sperm telomere length is associated with aging. Along with the changes in the telomere length level, the total and hybrid TERRA levels and the transcript levels of the *Rad51*, *Exo1*, *Rb1*, *RNase H1* and *RNase H2* genes related to telomere regulation are also significant. As a result, we show that people who are exposed to TBI repeatedly, especially those engaged in

sports such as football and boxing, have the risk of transmitting the possible effects of TBI to their offspring paternally.

**Keywords:** Genomic Instability; Sperm; Telomere; TERRA; Traumatic Brain Injury



## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                                                                                               |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| İÇ KAPAK.....                                                                                                                                                                                 | i    |
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....                                                                                                                                                                  | ii   |
| YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....                                                                                                                                                                 | iii  |
| KABUL ONAY SAYFASI.....                                                                                                                                                                       | iv   |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                                                                                                                 | v    |
| ÖZET.....                                                                                                                                                                                     | vi   |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                                                                 | viii |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                                                                                                             | x    |
| KISALTMALAR .....                                                                                                                                                                             | xiii |
| TABLolar LİSTESİ.....                                                                                                                                                                         | xiv  |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                                                                                                                                        | xv   |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                                                                                                                                                         | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                                                                                                                                       | 4    |
| 2.1 Travmatik Beyin Hasarı (TBH).....                                                                                                                                                         | 4    |
| 2.1.1 Tanım.....                                                                                                                                                                              | 4    |
| 2.1.2 Epidemiyoloji.....                                                                                                                                                                      | 5    |
| 2.1.3 Patofizyoloji.....                                                                                                                                                                      | 5    |
| 2.1.4 TBH'nın Şiddetinin Sınıflandırılması.....                                                                                                                                               | 6    |
| 2.1.5 TBH'ndan Sonra HPA ve HPG Aksının Regülasyonu.....                                                                                                                                      | 8    |
| 2.2 Telomer Biyolojisi.....                                                                                                                                                                   | 11   |
| 2.2.1 Tanım.....                                                                                                                                                                              | 11   |
| 2.2.2 Telomer Yapısı .....                                                                                                                                                                    | 11   |
| 2.2.3. Telomerlerde Uç Replikasyon Problemi.....                                                                                                                                              | 12   |
| 2.2.4. Hücresel Yaşlanma Sürecinde Telomer.....                                                                                                                                               | 14   |
| 2.3. Telomeric Repeat Containing RNA (TERRA).....                                                                                                                                             | 15   |
| 2.4. TERRA'nın Fonksiyonunu Yerine Getirebilmesi İçin Gerekli Olan ve DNA Hasar Cevabında Rol Oynayan Genler: <i>Rad51</i> , <i>Exo1</i> , <i>Rb1</i> , <i>RNase H1</i> ve <i>RNase H2</i> 18 |      |
| 2.4.1. <i>Rad51</i> .....                                                                                                                                                                     | 18   |
| 2.4.2. <i>Exonuclease 1 (Exo1)</i> .....                                                                                                                                                      | 18   |

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.3 Retinoblastoma Transcriptional Corepressor 1 ( <i>Rb1</i> ) .....                                 | 19 |
| 2.4.4 Ribonükleaz H 1/2 ( <i>RNase H1/ RNase H2</i> ) .....                                             | 19 |
| 2.5. Çevresel Faktörlerin Sperm Genomu Üzerine Etkisi .....                                             | 20 |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....                                                                               | 24 |
| 3.1 GEREÇLER .....                                                                                      | 24 |
| 3.1.1 Sarf Malzemeler.....                                                                              | 24 |
| 3.1.2 Demirbaş Malzemeler.....                                                                          | 24 |
| 3.2 YÖNTEMLER .....                                                                                     | 25 |
| 3.2.1 TBH Fare Modelinin Oluşturulması .....                                                            | 26 |
| 3.2.2 Sperm Örneklerinde Majör DNA Hasar Analizi .....                                                  | 27 |
| 3.2.2.1. Hoechst Boyama .....                                                                           | 27 |
| 3.2.2.2. Sperm Örneklerinde Akridin Oranj Boyama .....                                                  | 28 |
| 3.2.3 Sperm Örneklerinden Total RNA İzolasyonu .....                                                    | 29 |
| 3.2.4 Sperm Örneklerinden DNA İzolasyonu.....                                                           | 30 |
| 3.2.5 Sperm Örneklerinden DNA:RNA Hibrit İzolasyonu.....                                                | 31 |
| 3.2.6 Telomer Uzunluğunun Belirlenmesi.....                                                             | 31 |
| 3.2.7 Total RNA ve Hibrit DNA:RNA Örneklerinden TERRA Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....        | 33 |
| 3.2.8. Total ve Hibrit TERRA Ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR'da Belirlenmesi .....               | 34 |
| 3.2.9 mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Real Time PCR'da Belirlenmesi .....                                 | 35 |
| 3.3 İstatistiksel Analiz: .....                                                                         | 36 |
| 4. BULGULAR .....                                                                                       | 37 |
| 4.1. TBH'ndan Sonra Sperm Hücrelerinde Hoechst ve Akridin Oranj Boyama Sonuçları.....                   | 38 |
| 4.2. mTBH ve r-mTBH'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait Sperm Hücrelerinde Telomer uzunlukları ..... | 39 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3. mTBH ve r-mTBH'ndan Sonra Akut ve Kronik Gruplara Ait Sperm Hücrelerinden Elde Edilen Total RNA Örneklerinde Total TERRA Ekspresyon Seviyeleri.....                                                                                                         | 40 |
| 4.4. mTBH ve r-mTBH'ndan Sonra Akut Ve Kronik Gruplarda Sperm Hüclerinden İzole Edilen DNA:RNA Hibritlerinde Hibrit TERRA Ekspresyon Seviyeleri .....                                                                                                            | 41 |
| 4.5. TBH'ndan Sonra Akut ve Kronik Dönemde Sperm Telomer Uzunluğu, Sperm DNA:RNA Hibritlerinde Hibrit TERRA ve Sperm Total RNA Örneklerinde Total TERRA Seviyelerinin Birlikte Gösterilmesi.....                                                                 | 42 |
| 4.7. mTBH ve r-mTBH'ndan Sonra Akut ve Kronik Gruplara Ait Sperm Hüclerinden Telomer Uzunluğunun ve DNA Hasar Cevabının Regülasyonunda Görevli <i>Rad51</i> , <i>Exo1</i> , <i>Rb1</i> , <i>RNase H1</i> ve <i>RNase H2</i> Genlerin Transkript Seviyeleri ..... | 43 |
| 4.8. Total TERRA ve Genler Arasında Korelasyon Analizi .....                                                                                                                                                                                                     | 45 |
| 4.9. DNA:RNA Hibrit TERRA ve Genler Arasında Korelasyon Analizi.....                                                                                                                                                                                             | 45 |
| 4.10. Telomer Uzunluğu ve Genler Arasında Korelasyon Analizi .....                                                                                                                                                                                               | 46 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                                                                                                                                                                                                                       | 47 |
| 6. KAYNAKLAR .....                                                                                                                                                                                                                                               | 57 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                                                                                                                                                                                   | 69 |

## KISALTMALAR

|                   |                                                  |
|-------------------|--------------------------------------------------|
| <b>ACTH</b>       | : Adrenokortikotropik Hormon                     |
| <b>Bdnf</b>       | : Beyinden Türetilen Nörotrofik Faktör           |
| <b>CBF</b>        | : Serebral Kan Akışı                             |
| <b>CRH</b>        | : Kortikotropin Releasing Hormon                 |
| <b>DDR</b>        | : DNA Tamir Yanıtı                               |
| <b>Exo1</b>       | : Exonuclease 1                                  |
| <b>FSH</b>        | : Folikül Uyarıcı Hormon                         |
| <b>GHRH</b>       | : Growth Hormone–Releasing Hormone               |
| <b>GKS</b>        | : Glaskow Koma Skalası                           |
| <b>GnRH</b>       | : Gonodotropin Releasing Hormon                  |
| <b>GR</b>         | : Glukokortikoid Reseptör                        |
| <b>HPA</b>        | : Hipotalamus-Hipofiz-Adrenal Aks                |
| <b>HPG</b>        | : Hipotalamus–Hipofiz–Gonadal Aks                |
| <b>Igf2</b>       | : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2               |
| <b>Igf2-R</b>     | : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2 Reseptörü     |
| <b>lncRNA</b>     | : Uzun Kodlanmayan RNA                           |
| <b>Lept-R</b>     | : Leptin Reseptör                                |
| <b>LH</b>         | : Luteinize Edici Hormon                         |
| <b>mTBH</b>       | : Hafif Şiddetli Travmatik Beyin Hasarı          |
| <b>Oxy-R</b>      | : Oksitosin Reseptör                             |
| <b>PVN</b>        | : Paraventriküler Çekirdek                       |
| <b>Rb1</b>        | : Retinoblastoma Transcriptional Corepressor 1   |
| <b>r-mTBH</b>     | : Tekrarlı Hafif Şiddetli Travmatik Beyin Hasarı |
| <b>RNase H1/2</b> | : Ribonükleaz H1/2                               |
| <b>TBH</b>        | : Travmatik Beyin Hasarı                         |
| <b>TERRA</b>      | : Telomeric Repeat Containing RNA                |
| <b>Tert</b>       | : Telomeraz Reverse Transkriptaz                 |
| <b>TSH</b>        | : Triotropin Releasing Hormon                    |

## TABLOLAR LİSTESİ

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Glasgow Koma Skalası skorları .....                                                                      | 4  |
| <b>Tablo 2.</b> TBH şiddetinin sınıflandırılması .....                                                                   | 6  |
| <b>Tablo 3.</b> Telomer uzunluklarının belirlenmesinde kullanılan primerlerin sekansları...                              | 32 |
| <b>Tablo 4.</b> Telomer standart serisi.....                                                                             | 32 |
| <b>Tablo 5.</b> 36B4 standart serisi .....                                                                               | 32 |
| <b>Tablo 6.</b> Ekspresyonu seviyesi belirlenen genlerin primer sekansları .....                                         | 35 |
| <b>Tablo 7.</b> Gruplar içinde Total TERRA ve DNA:RNA hibritleriyle telomer uzunluğu<br>arasında korelasyon analizi..... | 42 |
| <b>Tablo 8.</b> Total TERRA ve genler arasındaki korelasyon analizi sonuçları.....                                       | 45 |
| <b>Tablo 9.</b> DNA:RNA Hibrit TERRA ve genler arasındaki korelasyon analizi<br>sonuçları.....                           | 45 |
| <b>Tablo 10.</b> Telomer uzunluğu ve genler arasında korelasyon analizi sonuçları. ....                                  | 46 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b>  | HPG aksındaki hormonal döngüyü gösteren şema .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 10 |
| <b>Şekil 2.</b>  | Ökaryot kromozomlarının genel yapısı .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 12 |
| <b>Şekil 3.</b>  | Hücre Bölünmesi ve Telomer Kısılması .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 14 |
| <b>Şekil 4.</b>  | TERRA'nın Telomerler Üzerinde Regülasyonu (Roake ve Artandi, 2017). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 16 |
| <b>Şekil 5.</b>  | Tez çalışmasının şematik olarak gösterimi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 25 |
| <b>Şekil 6.</b>  | Marmarou travma aleti .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 26 |
| <b>Şekil 7.</b>  | Akridin Oranj boyama görüntüsü: (a) normal, (b) orta derecede denatüre ve (c) tamamen denatüre spermatozoa.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 29 |
| <b>Şekil 8.</b>  | TBH'dan sonra r-mTBH akut, r-mTBH kronik, mTBH akut, mTBH kronik ve kontrol gruplarının sperm hücrelerinde Hoechst ve Akridin Oranj boyama sonuçları.....                                                                                                                                                                                                            | 38 |
| <b>Şekil 9.</b>  | mTBH ve r-mTBH gruplarına ait sperm hücrelerindeki telomer uzunluklarının gruplar arasında karşılaştırılması (*p<0,05, **p<0,01 ***p<0,001 ****p≤0,0001) .....                                                                                                                                                                                                       | 39 |
| <b>Şekil 10.</b> | mTBH ve r-mTBH'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait sperm hücrelerinden elde edilen RNA örneklerinde total TERRA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (*p<0,05, **p<0,01). .....                                                                                                                                                                             | 40 |
| <b>Şekil 11.</b> | mTBI ve r-mTBI gruplarının sperm örneklerinden izole edilen Sperm hücrelerinde elde edilen DNA örneklerinden izole edilen DNA:RNA Hibrit örneklerinde hibrit TERRA ekspresyon seviyeleri (****p≤0,0001) . .....                                                                                                                                                      | 41 |
| <b>Şekil 12.</b> | TBH'dan sonra akut ve kronik mTBI gruplarına ait sperm hücrelerinde telomer uzunluğu, B. TBH'dan sonra akut ve kronik mTBI gruplarına ait sperm hücrelerinde total TERRA ekspresyon seviyeleri, C. TBH'dan sonra akut ve kronik mTBI gruplarına ait sperm hücrelerinde DNA:RNA hibrit TERRA ekspresyon seviyeleri (*p<0,05, **p<0,01 ***p<0,001 ****p≤0,0001). ..... | 42 |
| <b>Şekil 13.</b> | Rad51, Exo1, Rb1, RNase H1 ve RNase H2 genlerinin mRNA transkript seviyeleri. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 43 |

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Travmatik Beyin Hasarı (TBH) dünya çapında en yaygın ölüme ve sakatlığa neden olan bir halk sağlığı problemidir ve organizma için oldukça stres oluşturan bir durumdur. Bununla birlikte hafif TBH (mTBH) özellikle ergenlerin ve adölesanların sıklıkla maruz kaldığı en yaygın TBH türüdür; ancak, mTBH'nın doğru tespiti hala sorun olmaya devam etmektedir. Beyin sarsıntısı olarak da bilinen mTBH, beyne giden bir dış biyomekanik kuvvetten kaynaklanır ve bu, yaralanma sonrası erken dönemde nörodavranışsal ve bilişsel bozukluklara neden olabilir. mTBH en fazla sporcularda meydana gelmektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan istatistiklere göre, rekabetçi spor aktiviteleri kapsamında yılda 1,6–3,8 milyon kişi tekrarlı olarak mTBH'na maruz kalmaktadır; ancak bunların yaklaşık yarısı bildirilmemekte ve bu sayı sporla ilgili tüm yaralanmaların % 5-9'unu oluşturmaktadır (Tayebi ve ark, 2021).

TBH'ndan sonra TBH'nın oluşturduğu stres ile birlikte HPA aksı aktive olur ve kortizol sekresyonu artar (Taheri ve ark, 2021). Bununla birlikte TBH'dan sonra baskılanan HPG aksı, üreme işlevi için yani spermatogenez ve oogeneze süreçleri için gereklidir. HPG aksının işleyişi hipotalamustan Hipotalamik gonadotropin-salgılatıcı hormon (GnRH) salgılanması ile başlar ve GnRH ön hipofizden gonadotropinlerin, Luteinize hormon (LH) ve Folikül sitümüle edici hormon (FSH) salınmasını tetikler. LH ve FSH, sırasıyla gonadal seks steroidi (östradiol, progesteron ve testosteron) sentezini, salgılanmasını ve gamet olgunlaşmasını uyarır (Balhorn, 2011; Panara ve ark, 2019) Sonuçta TBH'na bağlı olarak aktive olan HPA aksı ve baskılanan HPG aksı sonucunda spermatogenez süreci ve sperm genomu etkilenebilir.

HPA aksının aktive olmasıyla birlikte kortizol sekresyonu artar. Literatürde kortizolün yaşlanma ve telomer regülasyonu üzerindeki etkisi zaten bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda farklı stres kondisyonlarının telomer kısalmasını tetiklediği de

gösterilmiştir. Fakat özellikle sporcuların maruz kaldığı tekrarlayan TBH'nın organizma üzerine etkisi ve bu etkinin sonraki nesiller üzerine etkisi olup olmadığı bilinmemektedir. Çevresel faktörlerin özellikle maruz kalınan stresin sperm RNA komponentini yani epigenetik kalıtımı değiştirdiğini gösteren ilk veriler Katharina Gapp ve arkadaşlarının laboratuvarından bildirilmiştir. Bu çalışmada erken yaştaki travmatik stresin, spermde birkaç miRNA ve piRNA kümesinde uzun süreli değişikliklere neden olduğunu ve çocukta stresle başa çıkma davranışlarında, metabolizmada ve stres kaynaklı glikoz salınımında karmaşık değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir (Gapp ve ark, 2014).

Uzun yıllar boyunca telomerlerin transkripsiyonel olarak sessiz olduğu telomer bölgelerinden RNA transkripsiyonunun gerçekleşmediği düşünülmüştür; ancak 2007'de, bazı kromozom uçlarında bulunan subtelomer bölgelerinden Telomeric Repeat Containing RNA (TERRA) adı verilen uzun kodlanmayan RNA'ların (lncRNAs) transkribe olduğu bildirilmiştir. TERRA'nın hem kromozom uçlarını degradasyondan koruduğu hem de genom stabilizasyonunu sağladıkları literatürde gösterilmiştir (Azzalin ve ark, 2007). TERRA'nın ekspresyon seviyesinde meydana gelen artma ve azalmalar, değişen telomer uzunluğu, genomik instabilite, kontrolsüz hücre bölünmesi ve hücresel yaşlanma ile ilişkilidir. TERRA transkriptlerinin kromozom uçlarında telomerler arasında homolog rekombinasyonu teşvik ettiği, hücresel yaşlanmayı geciktirdiği ve genom stabilizasyonunun korunması için DNA:RNA hibritleri oluşturduğunu göstermektedir (Wang ve ark, 2015).

Çevresel faktörlerin sperm genomu üzerindeki etkisi ve TBH'nın sperm üzerinde oluşturabileceği potansiyel hasar dikkate alınarak yapılan bu tez çalışmasının hipotezi, özellikle tekrarlı TBH'nın sperm hücrelerinin epigenomunu ve telomer fonksiyonunu değiştirebileceğidir.

Bu hipotezden yola çıkarak planladığımız projede hafif TBH (mTBI) ve tekrarlı hafif TBH (r-mTBH) fare modeli oluşturarak TBH'dan sonra akut ve kronik dönemde travmaya maruz kalan farelerin sperm hücrelerinde TBH'nın telomer fonksiyonu ve genom stabilizasyonu üzerine etkisinin; telomer uzunluğu, total ve hibrit TERRA seviyeleri ve TERRA, telomer uzunluğu ve DNA hasar cevabının regülasyonunda görevli *Rad51*, *Exo1*, *Rb1*, *RNase H1* ve *RNase H2* transkript seviyeleri üzerinden

araştırılması amaçlanmıştır.

Planlanan projeden elde edilecek veriler ile henüz doğru tespiti yapılamayan, verdiği hasarın boyutu tam olarak belirlenemeyen ve özellikle sporla uğraşan ergenlerin sıklıkla maruz kaldığı mTBH'nın sperm genomu üzerine etkisi olup olmadığı belirlenerek bir sonraki jenerasyon üzerinde olası bir riski taşıyıp taşımayacağı belirlenmiş olacaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Travmatik Beyin Hasarı (TBH)

#### 2.1.1 Tanım

TBH, bilişsel yeteneklerde veya fiziksel işlevsellikte bozulmaya neden olan, azalmış veya değişmiş bilinç durumları üretebilen, kranium ve koruduğu nöral yapılara yönelik dışarıdan gelen mekanik kuvvetin sonucu ortaya çıkan geçici ya da kalıcı hasar durumu olarak tanımlanır (Bush, 1988).

TBH sonrası bilinç kaybı ve amnezi, akut beyin hasarı şiddetini değerlendirmek için kullanılan en yaygın klinik göstergelerdir. Bilinç düzeyini değerlendirmek için kullanılan en yaygın araç Glasgow Koma Skalası (GKS)'dir (Tablo 1). Buna göre GKS'si 8 skorun altında olan hastalar ağır, 9-12 skorun arasındakiler orta, 13-15 skorun arasındakiler de hafif kafa travması olarak kabul edilir (Teasdale ve Jennett, 1974).

**Tablo 1.** Glasgow Koma Skalası skorları

| Yanıt türü        |                     | Skor |
|-------------------|---------------------|------|
| Gözlerin Açılması | Spontan             | 4    |
|                   | Konuşma             | 3    |
|                   | Ağrı                | 2    |
|                   | Hiçbiri             | 1    |
| Motor             | Komutlara Uyma      | 6    |
|                   | Bölgesel Ağrı       | 5    |
|                   | Geri çekme Refleksi | 4    |
|                   | Anormal Fleksiyon   | 3    |
|                   | Uzatma              | 2    |
|                   | Cevap yok           | 1    |
| Sözel             | Yöneltilmiş         | 5    |
|                   | Karmaşık            | 4    |
|                   | Uygun Olmayan       | 3    |
|                   | Anlaşılmaz          | 2    |
|                   | Cevap yok           | 1    |

### 2.1.2 Epidemiyoloji

TBH organizma için ağır stres oluşturan bir durumdur ve dünya çapında yılda 64 ila 74 milyon insanın etkilendiği en yaygın ölüm ve sakatlığa neden olan bir halk sağlığı problemidir. Beyne zarar veren tüm yaralanma türleri arasında, ölüm veya kalıcı sakatlık ile sonuçlanma olasılığı en yüksek olanıdır (Dewan ve ark, 2018).

Global Burden of Disease Study'nin 2016 yılında elde edilen verilere göre dünya genelinde 27,08 milyon yeni TBH vakası olduğunu ve yaşa göre standardize edilmiş insidans oranlarının yılda 100.000 nüfus başına 369 olduğu bildirilmiştir. Bu raporda Türkiye için yaşa göre standardize edilmiş insidans oranlarının yılda 100.000 nüfus başına 283 ile 352 arasında değiştiği bildirilmiştir (James ve ark, 2019). TBH'nın birincil nedenleri yaşa, sosyoekonomik faktörlere ve coğrafi bölgeye göre değişiklik göstermektedir. Düşük ve orta gelirli ülkeler, yüksek gelirli ülkelere göre neredeyse üç kat daha fazla TBH vakası ile karşılaşmaktadır (Dewan ve ark, 2018)

Sosyoekonomik durumdan bağımsız olarak yaşa göre TBH vaka sayıları değişmektedir. Yaşa bağlı TBH vaka sayısı farklılıkları, en yüksek prevalansa sahip üç ana yaş grubunu göstermektedir:

- Erken çocukluk (başlıca neden düşme)
- Geç ergenlik / erken yetişkinlik (ana neden trafik kazaları)
- Yaşlı (başlıca neden düşme)

Son araştırmalarda, kafa travmasının ana nedenleri, trafik kazaları, şiddet olayları, düşmeler, sporla ilgili kafa travması (hokey, futbol), dövüş sporları (boks ve kickboks) ve patlama yaralanmalarına neden olan savaşa ilgili kazalar kronik tekrarlayan kafa travması ile karakterizedir (Tucker, Fu, ve McCabe, 2016).

### 2.1.3 Patofizyoloji

TBH'dan sonraki serebral hasarın ilk aşamaları, doğrudan doku hasarı ve serebral kan akışının (CBF) ve metabolizmanın bozulmuş düzenlenmesi ile karakterize edilir. Bu "iskemi benzeri" patern, anaerobik glikoliz, artan membran geçirgenliği ve ardışık ödem oluşumu nedeniyle laktik asit birikimine yol açar.

Anaerobik metabolizma, hücresel enerji durumlarını sürdürmek için yetersiz olduğundan, ATP depoları tükenir ve enerjiye bağlı membran iyon pompalarında arıza meydana gelir.

Patofizyolojik kaskadın ikinci aşaması, uyarıcı nörotransmitterlerin (yani glutamat, aspartat) aşırı salınımı, N-metil-D-aspartat, a-amino-3-hidroksi-5-metil-4'ün aktivasyonu, voltaja bağlı  $Ca^{2+}$  ve  $Na^+$  kanalları ile birlikte terminal membran depolarizasyonu ile karakterize edilir (Werner ve Engelhard, 2007).

Ardışık  $Ca^{2+}$  ve  $Na^+$  akışı, katabolik hücre içi süreçlere yol açar.  $Ca^{2+}$  lipid peroksidazları, proteazları ve fosfolipazları aktive eder ve bu da hücre içi serbest yağ asitleri ve serbest radikallerin konsantrasyonunu artırır. Ek olarak, kaspazların, translokazların ve endonükleazların aktivasyonu, biyolojik membranların ve nükleozomal DNA'nın (DNA fragmentasyonu ve DNA onarımının inhibisyonu) ilerleyici yapısal değişikliklerini başlatır. Bu olaylar vasküler ve hücre yapısının membran bozulmasına ve nihayetinde nekrotik veya programlanmış hücre ölümüne yol açar (Werner ve Engelhard, 2007).

#### 2.1.4 TBH'nın Şiddetinin Sınıflandırılması

TBH'nın şiddetinin derecelendirilmesinde Glasgow Koma Skalası, TBH hafif, orta veya şiddetli olarak derecelendirmek için kullanılır (Tablo 2) (Jonathan ve ark,2011). GKS uyaranlara sözlü, motor ve göz açma tepkilerinden ölçülen bilinç düzeyine dayanır. GKS, basit ve bir dizi hastadaki sonuçları karşılaştırmak için kullanılabilir standart bir ölçüm aracı olarak tercih edilmektedir (Jonathan ve ark,2011).

**Tablo 2.** TBH şiddetinin sınıflandırılması

| Kriter                      | Hafif Şiddetli (mTBH) | Orta Şiddetli TBH    | Şiddetli TBH                          |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------------------|
| Yapısal Görüntüleme         | Normal                | Normal ya da Anormal | Normal ya da Anormal                  |
| Bilinç Kaybı                | 0-30 dk               | >30 dk ve 24 saat    | >24 saat                              |
| Zihinsel Durumda Değişiklik | 24 saate kadar        | >24 saat             | Diğer kriterlere bağlı olarak değişir |
| Post-Travmatik Amnezi       | ≤1 gün                | >1 gün ve >7 gün     | >7 gün                                |
| Glasgow Koma Skalası        | 13–15                 | 9–12                 | 3–8                                   |

Beyin fonksiyonunun fizyolojik hasarlanması, zihinsel durum değişimleri, bilinç kaybı, hafıza kaybı veya fokal nörolojik bozulmaların en az birinin travmatik olay sonrası ortaya çıkmasıyla meydana gelir (Jonathan ve ark,2011). Hafif TBH (mTBH) en yaygın TBH türüdür; ancak, mTBH'nın doğru tespiti hala sorun olmaya devam etmektedir.

Beyin sarsıntısı olarak da bilinen mTBH, beyne giden bir dış biyomekanik kuvvetten kaynaklanır ve bu, yaralanma sonrası erken dönemde nörodavranışsal ve bilişsel bozukluklara neden olur. mTBH en fazla sporcularda meydana gelmektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan istatistiklere göre, rekabetçi spor aktiviteleri kapsamında yılda 1,6–3,8 milyon kişi mTBH'na maruz kalmaktadır; ancak bunların yaklaşık yarısı bildirilmemekte ve bu sayı sporla ilgili tüm yaralanmaların % 5-9'unu oluşturmaktadır (Tayebi ve ark, 2021).

mTBH sonrasında meydana gelen bilişsel bozukluklar arasında; dikkat eksikliği, konsantrasyon bozukluğu ve yönelme hızında azalma, bellek problemlerinde sorun, kaybolmalar veya kafa karışıklığı görülür. Psikososyal değişimler arasında; sinirlilik hali, depresyon durumu, anksiyete ve duygusal ruh hali değişimleri görülmektedir. Fiziksel değişimlerde ise baş ağrısı, yorgunluk hali, uyku bozukluğu, görme bozukluğu, baş dönmesi, mide bulantısı ve denge sorunları görülmektedir (Masel ve DeWitt, 2010).

Tek bir mTBH her zaman davranışsal bozulmalara neden olmamakla birlikte, klinik araştırmalar, tekrarlı olarak meydana gelen mTBH'nın kümülatif etkileye neden olduğunu göstermektedir (Belanger, Spiegel ve Vanderploeg, 2010; Geddes ve ark, 1999).

Tekrarlayan hafif şiddetli travmatik beyin hasarı (r-mTBH) dünya çapında bir sorun haline gelen, beynin birden fazla şiddete maruz kalarak hasara uğradığı, akut ve kronik hasarlar oluşturan mTBH türü yaralanmalardır. mTBH'na sıklıkla adölesanlar ve ergenler maruz kalmaktadırlar ve r-mTBH'nın kronik etkisi özellikle, r-mTBH öyküsü olan emekli amerikan futbolcularında, artmış bilişsel bozulma, uzun süreli psikiyatrik hastalık ve artmış kronik travmatik ensefalopati, progresif bir tauopati sıklığının artması ile gösterilmiştir (Guskiewicz ve ark, 2005).

Birden fazla ve sıklıkla maruz kalınan mTBH yaralanmanın etkisinin sürdürülmesine neden olmaktadır (Tremblay ve ark, 2013; Zemper, 2003). Tekrarlı mTBH öyküsü olan hastalarda öğrenme ve hafıza bozukluğu artar, dengesiz iyileşme yavaşlar, görme bozukluğu, konsantrasyon güçlüğü ve baş ağrısı insidansı artar ( Fakharian ve ark, 2016; Gaetz ve ark, 2000; Wall ve ark, 2006).

Tek bir yaralanmadan meydana gelen semptomlar kendiliğinden düzelirken, tekrarlanan yaralanmalar semptomların uzun süreli etkilere neden olabilmektedir (Halstead, Walter ve Moffatt, 2018; E. J. Pellman ve ark, 2003). Literatürde mevcut olan çalışmalar

tekrarlayan mTBH ile demans gelişme riski ve diğer nörodejeneratif hastalıklar arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir (Guskiewicz ve ark, 2005; Masel ve DeWitt, 2010; McKee ve ark, 2009).

Ayrıca travmanın ciddiyetine bakılmaksızın birçok hastada nöro-davranışsal değişiklikler görülmektedir. Bu hastalarda sıklıkla bilişsel, davranışsal ve duygusal işlevsellikteki önemli değişiklikler yaygındır. Özellikle şiddetli ve orta dereceli TBH sıklıkla birçok geçici veya kalıcı fiziksel, bilişsel, davranışsal ve duygusal bozulmalar görülmektedir. Bilişsel şikâyetler tipik olarak hafıza, dikkat ve yürütücü işlevsellik alanlarındaki bozuklukları içerir. Ayrıca, artmış irritabilite, depresyon veya anksiyete çoğu kez TBH maruz kalan kişilerde bildirilmektedir (Ashman ve ark, 2006). Davranış testleri, TBH'nın klinik öncesi ve sonraki tedavinin kontrollü bir laboratuvar ortamında motor, bilişsel (öğrenme ve bellek) ve nöropsikiyatrik / sosyal fonksiyon üzerindeki etkilerini araştırmasına izin verir. Literatürdeki birçok çalışmada post-travmatik yaralanmalar sonrası davranışsal değişiklikler olduğu gösterilmiştir (Keleştimur, 2005).

Bugün özellikle spora bağlı tekrarlayan travma genellikle epidemiyolojik çalışmaların çoğunda TBH'nın nedeni olarak düşünülmekte ve sporcularda ortaya çıkan birtakım hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Boks, amerikan futbolu, futbol, buz hokeyi ve dövüş sanatlarını içeren temas sporlarının akut veya kronik TBH'na neden olduğu yakın zamanda bildirilmiştir (Keleştimur, 2005). Her ne kadar kronik TBH, spora aşırı maruz kalmadıkları sürece amatör boksörlerde nadiren görülse de, yine de bu konuda yeterli çalışma yoktur (Rabadi ve Jordan, 2001). Birden fazla yumrukta biriken hasarın yanı sıra sadece bir basit yumruk bile serebral sarsıntıya neden olabilmektedir. Bu yüzden, boks ve futbol gibi kafaya tekrarlı darbe alınan spor dalları; beyin yaralanmalarına, bilinç kaybına ve nörolojik anormalliklere neden olabilecek kronik tekrarlayan TBH ile ilişkilidir. Birçok boksör dövüş sonrası hafıza kaybından ziyade günlük hayatlarında yaşam kalitesini etkileyecek hafıza bozuklukları yaşamakta ve hipofiz yetmezliği, demans gibi birçok hastalıkla karşı karşıya kalmaktadır (Ohhashi ve ark, 2002; Zhang ve ark, 2003).

### **2.1.5 TBH'ndan Sonra HPA ve HPG Aksının Regülasyonu**

Stres genellikle organizma homeostazına karşı gerçek veya algılanan tehdit durumu olarak bilinmektedir. Homeostazın, stres faktörleri varlığında sürdürülmesi, stres yanıtı olarak bilinen endokrin, sinir ve bağışıklık sistemlerini içeren karmaşık bir cevap

yelpazesinin aktivasyonunu gerektirir (Carrasco ve Van De Kar, 2003; Chrousos ve Gold, 1992). Stres tepkisinin aktivasyonu, bir dizi davranışsal ve homeostatik zorluklarla karşılaşıldığında bireyin hayatta kalma şansını artıran fizyolojik değişiklikler yelpazesinin aktivasyonunu gerektirir (Chrousos ve Gold, 1992). Geniş fizyolojik yapılanma nedeniyle ve stres tepkisinin potansiyel olarak patojenik etkileri, bir dizi nöral ve endokrin sistem, bu uyarlanabilir süreci sıkı bir şekilde düzenlemek için işlev görür (Smith ve Vale, 2006).

Stres tepkisine eşlik eden anatomik sistemler hem Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'de hem de periferik dokularda bulunur. Stres tepkisinin ana efektörleri, hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinde (PVN), hipofiz bezinin ön lobunda ve adrenal bezinde lokalizedir. Bu yapı koleksiyonuna yaygın olarak hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) aksı denir. HPA aksına ek olarak, diğer bazı yapılar psikolojik ve fizyolojik strese uyarlanabilir tepkilerin düzenlenmesinde hayati rol oynar. Bunlar beyin sapı noradrenerjik nöronları, sempatik adrenomedüller devreleri ve parasempatik sistemleri içerir (Smith ve Vale, 2006)

Akut ve kronik stres oluşturan pek çok durum HPA aksının aktivasyonunu sağlayarak strese karşı yeterli kortizol cevabının verilmesini sağlar ve TBH gibi organizma için oluşan stres durumunda verilen yeterli kortizol cevabı organizmanın hayatta kalımı için kritik önem taşımaktadır. Strese karşı oluşan yeterli kortizol düzeyi konak immün yanıtını ve kardiyovasküler sistemi düzenleyerek homeostazı sağlar. Kritik hastalıklar olarak tanımlanan travma, cerrahi girişim, yanık, kanama ve enfeksiyon gibi durumlarda salgılanacak olan yeterli kortizol düzeyi organizmanın hayatta kalması için şarttır. Organizma stres oluşturan bir durumla karşı karşıya kaldığında önce hipotalamustan Kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) salgısı artar, bu da sırasıyla hipofizden Adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgısını, salgılanan ACTH da adrenalden kortizol salgılanmasını uyarır (Armanios ve Blackburn 2012; Blackburn 2010; Greider ve Blackburn 1985). Aşırı kortizol ve kronik stres hücrel yaşlanmayı tetiklemektedir. TBH de organizma için bir stres durumudur ve stres durumunda kortizol salgısı artar (Pentelényi, 1992). Akut ve kronik stres oluşturan pek çok durum HPA aksının temel tetikleyici faktörlerindendir. Stres hormonu olan kortizol ve hücrel yaşlanma arasındaki bağlantıyı gösteren birçok çalışma vardır (Diman ve Decottignies 2018). Strese tepki olarak yeterli kortizol düzeyi konak immün yanıtını ve kardiyovasküler



bir sonraki jenerasyona aktarılma potansiyeli olup olmadığı henüz net olarak bilinmemektedir.

TBH sonrası meydana gelen ve organizma için stres oluşturan biyolojik etkiler düşünüldüğünde TBH'na bağlı olarak babaların maruz kaldığı stresin sperm genomu üzerine yeniden programlama etkisi olabilir.

## **2.2 Telomer Biyolojisi**

### **2.2.1 Tanım**

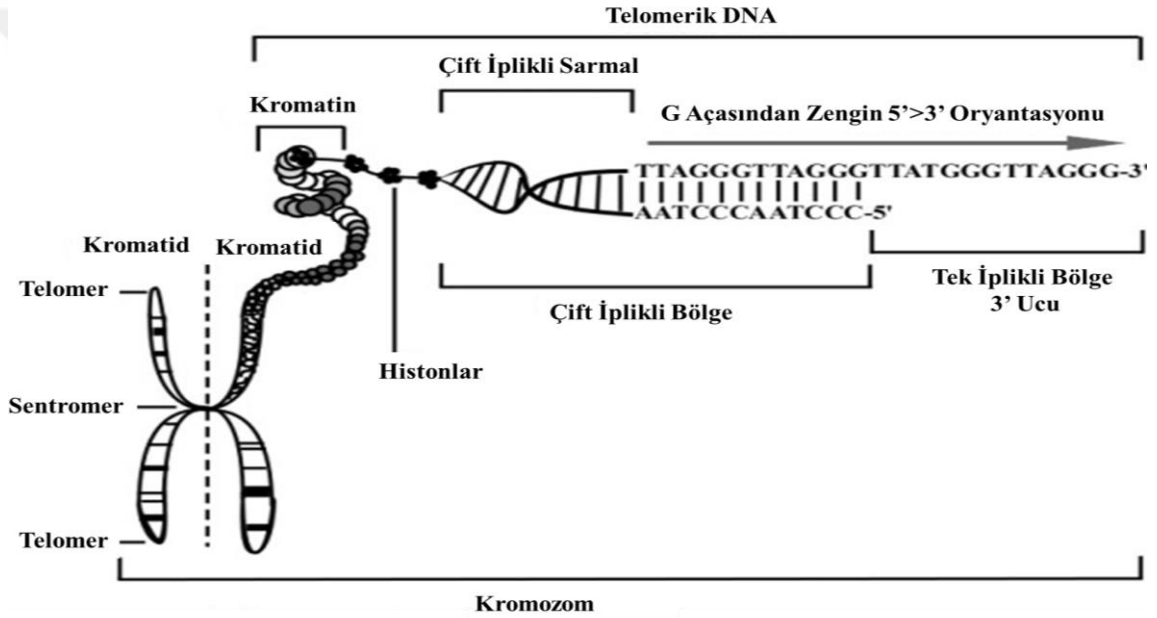
Telomerler, ökaryotlarda kromozom uçlarında genom stabilitesini sağlayan, kromozomun yerleştirilmesine aracılık eden, ardışık DNA tekrarlarından ve çok sayıda ilişkili proteinden oluşan telomeraz içermeyen hücrelerin yaşam süresini düzenleyen yapılardır. TTAGGG tekrarlarından ve altı farklı proteinden oluşan Shelterin kompleksi ile ilişkili temel heterokromatik yapılardır. Telomerlerin varlığı, kromozomların doğal uçlarını rastgele DNA kırılmalarından ayırarak, istenmeyen uçtan uca füzyonu veya nükleolitik bozunmayı önler. Kromozom uçlarının bu fiziksel korumasına ek olarak, ökaryotik telomerler, kromatin organizasyonu ve hücre proliferasyonunun kontrolü dahil olmak üzere hücresel süreçlerde önemli rollere sahiptir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, telomer homeostasisinin hastalıklarda ve insan yaşlanmasındaki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Saretzki, 2018; Wong ve Collins, 2003).

### **2.2.2 Telomer Yapısı**

Telomerin uç kısmı, bir t-döngüsü oluşturmak için çift sarmallı telomere geri dönen 3' ucunda G açısından zengin, tek sarmallı bir çıkıntı ile biter. Bu oluşumlar kromozom uçlarının uygun şekilde korunması için çok önemlidir. Telomer yapısının bozulması; genomik kararsızlığa ve hücresel ölüme katkıda bulunacak olan telomer erozyonu ve füzyon olaylarını meydana getirebilir. Doğru şekilde telomer fonksiyonunun korunması telomerik DNA'nın hatasız replikasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Fakat telomerlerin replikasyon mekanizması; tekrarlayan telomerik DNA dizisi, oluşturabileceği ikincil yapılar ve heterokromatin yapısı nedeniyle hatasız replikasyon oldukça zordur. Bu özelliklerinden dolayı telomer bölgeleri kırılğan yani daha çok mutasyona uğrama olasılığı yüksek olan bölgeler olarak tanımlanır.

Telomerlerin en patolojik özelliklerinden biri telomer replikasyonu için barikat görevi gören G-quadrupleks yapılarıdır. Klasik G-quadrupleks yapıları birbirine bağlanmış dört

guanin üçlüsünden oluşur (Lu ve ark, 2013). Telomer tandem tekrarındaki (TTAGGG) üçlü guanin akışı nedeniyle, telomerik DNA bu yapıları oluşturma konusunda yüksek bir eğilime sahiptir ve G-quadrupleksler replikasyon makinesine açık bir şekilde engel teşkil etmektedir. Bu nedenle bu bölgelerin uygun şekilde açılması ve çoğaltılması telomer bütünlüğü ve genomik stabilitenin sağlanması için çok büyük önem arz etmektedir. Kendilerine özgü replikasyon güçlüklerinin üstesinden gelmek için telomerler, replikasyon çatalında oluşan ikincil yapıları çözmek ve doğru replikasyonunu sağlamak için birçok helikaz ve nükleaz birlikte kompleks oluşturarak görev yapar (Stroik ve ark, 2020).



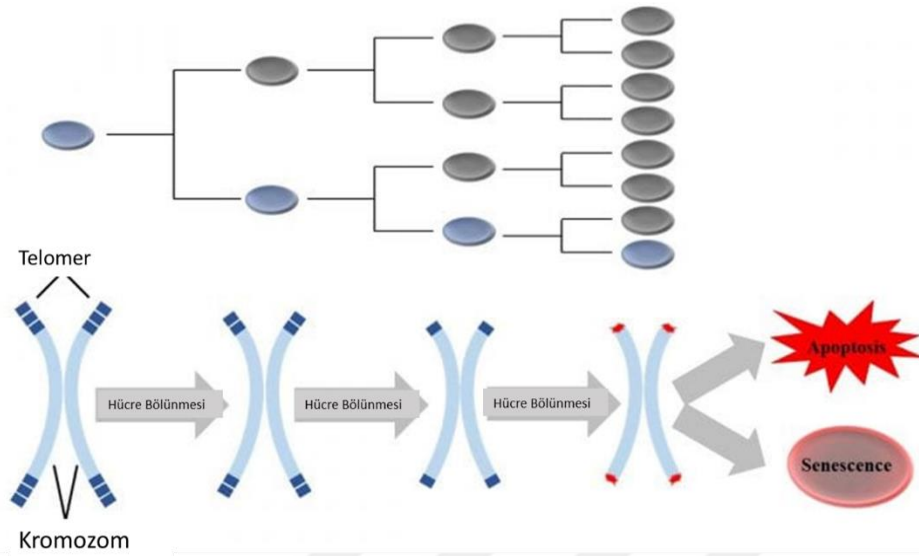
**Şekil 2.** Ökaryot kromozomlarının genel yapısı (Moon, 2007)

Yaşlanma sürecinde telomer uzunluğu, herhangi bir telomer uzatma mekanizması olmayan hücrelerde, hücre bölünmesi sırasında DNA replikasyonun moleküler mekanizması sonucu ve oksidatif stresin artmasından dolayı kısalmır. Telomerler kromozomal DNA dizilerinden hem yapısal hem de fonksiyonel olarak farklıdır. Telomer sentezinden telomeraz; telomer terminal transferaz veya revers transkriptaz enzimi sorumludur (Lupien ve ark, 1994).

### 2.2.3. Telomerlerde Uç Replikasyon Problemi

DNA'nın yarı korunumlu replikasyonu, orijinal DNA'yı her biri bir orijinal ve bir yeni zincire sahip iki çift DNA zinciri olacak ve yavru hücrelere dağıtılacak şekilde çoğaltma

işlemidir. DNA polimerazlar sadece  $5' \rightarrow 3'$  yönünde sentez yapar; sadece mevcut polinükleotid zincirlerini uzatabilirler ve bir kalıp oluşturmak için tamamlayıcı bir diziye ihtiyaçları vardır. Bu nedenle, geleneksel DNA polimerazlar, küt uçlu bir DNA molekülünün  $5'$  uçlarını sentezleyemez. Bir RNA primeri, DNA kalıbına  $3'$  ucuyla eşleştirilse bile, replikasyonda sonra çıkarılırlar ve  $5'$  terminal uçta boşluk oluşur. Bu nedenle, "replikasyon sonu problemi" nin erken başlangıcında, RNA primerinin çıkarılmasından kaynaklanan eksik kesintili iplik sentezi problemi olduğunu düşündürmektedir. Replikasyon, çift zincirli DNA molekülün ayrılmasıyla başlar, böylece her bir zincirin replikasyonu ayrı ayrı yapılır. İki iplik ayrıldığı için,  $5'$  ile  $3'$  yönünde yeni bazlar eklenmelidir. Bu görev, şablonu zıt polariteye sahip olan ve bazlar seri biçimde eklenmiş olan öndeki zincir üzerinde basittir. Karşıt gecikmeli iplikte,  $5'$  ile  $3'$  baz eklenmesini gerçekleştirmek için Okazaki fragmanları adı verilen segmentlerin oluşturulması gerekmektedir. Bu işlem için yeni bir RNA primeri sentezlenir ve her parçanın sentezini başlatmak için kullanılır ve sonunda parçalar sürekli bir iplik oluşturmak için ligaz enzimi ile birbirine bağlanır. Gecikmeli iplik veya 'geri' iplik, kromozomun sonuna yaklaştığında bir sorun oluşur ve bir sonraki Okazaki fragmanının, son Okazaki fragmanı ile kromozomun sonu arasındaki boşluğu doldurması için bir şablon görevi göreceği bir DNA yoktur. Böylece kromozomun uç kısmı kopyalanmaz ve telomerler giderek kısalır. Bu durum, son çoğaltma sorunu olarak bilinir. Neyse ki, bu problem, 46 insan kromozomunun her birinin, telomer adı verilen, harcanabilir, kodlanmayan DNA bazlarının uzun tekrarları ile kaplanmış olması sayesinde, temel genlerin kaybıyla sonuçlanmaz. Telomerik DNA'nın kaybı, telomerler, replikasyon durdurulacak kadar kritik derecede kısa bir uzunluğa ulaşana kadar ardışık bölünmelerle devam eder. İnsan hücrelerinin ortalama 40-60 bölünme geçirme potansiyeline sahip olduğu tahmin edilmektedir. En son noktada hücre büyümesi durur ve hücre yaşlanmaya girer (Şekil 3)(Meyerson, 2000; Wong ve Collins, 2003). Telomerlerde meydana gelen replikasyonun limitasyonu Hayflick limiti olarak adlandırılır (Shalev ve Hastings, 2017).



**Şekil 3.** Hücre Bölünmesi ve Telomer Kısalması (Shalev ve Hastings, 2017).

#### 2.2.4. Hücresel Yaşlanma Sürecinde Telomer

Hücresel yaşlanma ilk olarak Hayflick ve Moorhead tarafından insan somatik hücrelerinin proliferatif potansiyelinin ilerleyici ve geri döndürülemez kaybı olarak tanımlandı. Bu birincil insan fibroblastlarının daha sonra "Hayflick limiti" olarak anılan sınırlı sayıda (40-60 popülasyon) bölünebileceğini göstermiştir (Hayflick ve Moorhead, 1961). Hücresel yaşlanma sadece replikasyon kapasitesindeki bir kayıpla değil, aynı zamanda hücre morfolojisi, gen ekspresyonu, metabolizma, epigenetik ve diğer hücresel bir dizi dramatik değişikliklerle de karakterize edilir (Van Deursen, 2014).

Şimdiye kadar, replikatif yaşlanmanın en iyi açıklaması, kromozomların uçlarında bulunan proteinlerle ilişkili DNA tekrarlarından oluşan bölgeler olan telomerlerin kısalması olarak bilinmektedir. 1990'larda, telomer bölgelerinin hücre bölünmesiyle kademeli olarak kısaldığı ve bunun hücresel yaşlanmanın indüklenmesiyle ilişkili olduğu gösterildi (Harley ve ark, 1990). Telomerleri uzatabilen enzim telomerazının ektopik ekspresyonunun, hücre bölünmesi tarafından yönlendirilen telomer kısalmasını önlediği ve yaşlanma sürecini geciktirdiği gösterilmiştir. Bu deney, telomer uzunluğunun yaşlanmada sınırlayıcı faktör olduğunu ve bu nedenle süreçte nedensel bir rol oynadığını göstermiştir (Bodnar ve ark, 1998).

Bir hücrenin gerçekleştirebileceği bölünme sayısı hücre tipine ve organizma türüne göre değişiklik gösterir. Bir hücre üzerindeki stres arttığında veya telomerler çok kısa

olduğunda, hücre tümör oluşumunu önlemek için apoptoz veya yaşlanmaya uğrar (Jeyapalan ve ark, 2007). Telomer uzunluklarındaki en hızlı azalmanın, yaşamın ilk yıllarında hızlı büyüme nedeniyle yılda 1kb'den fazla olduğu görülür. Yetişkinlikte ise hücre tipine, proliferasyon davranışlarına ve oksidatif stres ve inflamatuvar süreçler dahil olmak üzere çevrelerine bağlı olarak yılda 20-60 bç kadar azalma gözlenir (Saretzki, 2018). Telomer uzunluğu, hücresel yaşlanmanın endojen bir belirteci olarak kabul edildiğinden, aynı zamanda biyolojik yaşlanmanın da varsayılan bir belirtecidir (Vasile ve ark, 2001). Evrimsel süreçte telomeraz içermeyen hücrelerde; yaşlanmayı tetikleyen moleküler saat olduğu öne sürülen telomer kısalmasının ayarlarıyla oynayarak, hücrenin yaşam süresini artırmak, çeşitli organizasyonel yapılar oluşturmak için telomer uzunluğunu düzenlemesi kaçınılmaz bir çözüm olarak gün yüzüne çıkmaktadır (Saretzki, 2018; Vasile ve ark, 2001).

### **2.3. Telomeric Repeat Containing RNA (TERRA)**

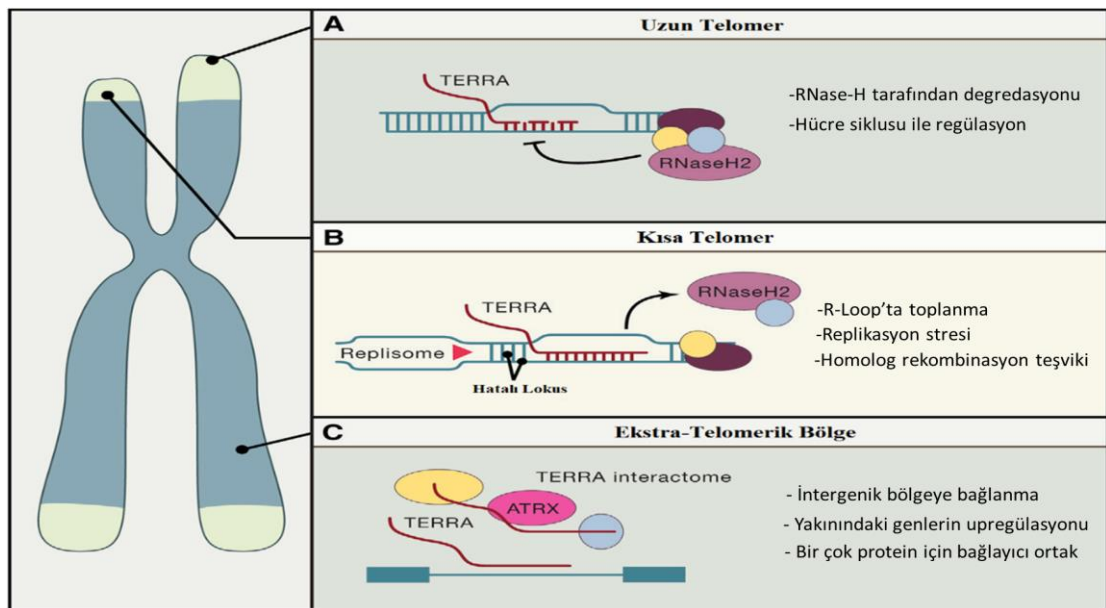
Kromozom uçlarına telomerik tekrarlar ekleyen telomerazın yokluğunda, telomerlerin sürekli kısalması koruyucu kapasitelerini tehlikeye atar, böylece kontrol noktası durmasına ve geri dönüşü olmayan hücresel yaşlanmaya yol açar (Balk ve ark, 2013).

Uzun yıllar boyunca telomerlerin transkripsiyonel olarak sessiz olduğu yani bu bölgelerden RNA transkripsiyonu yapılmadığı düşünülmüştür; ancak 2007'de, bazı kromozom uçlarında bulunan subtelomer bölgelerinden Telomeric Repeat Containing RNA (TERRA) adı verilen uzun kodlanmayan RNA'ların (lncRNAs) transkribe olduğu bildirilmiştir. Dahası, bu uzun kodlanmayan RNA'ların (TERRA) hem kromozom uçlarını degradasyondan koruduklarını hem de genom stabilizasyonunu sağladıkları literatürde gösterilmiştir (Azzalin ve ark, 2007). En önemlisi TERRA molekülleri subtelomer bölgelerinden transkribe olduktan sonra telomerlere yeniden hibridize olarak, telomeraz aktivitesini, telomer uzunluğunu ve ilişkili heterokromatinizasyonu düzenleyerek genomun stabilitesini sağlamaktadır. Bu nedenle hem TERRA transkript seviyesi hem de DNA'ya bağlanarak fonksiyonel olan Hibrit TERRA seviyesi telomer ve genom stabilizasyonun regülasyonunun korunması için önemlidir. TERRA transkriptlerinin ekspresyon seviyesindeki artma ve azalmalar, değişen telomer uzunluğu, genomik instabilite, kontrolsüz hücre bölünmesi ve hücresel yaşlanma ile ilişkilidir. Ortaya çıkan kanıtlar normal durumda TERRA transkriptlerinin kromozom uçlarında telomerler arasında homolog rekombinasyonu teşvik ettiği, hücresel

yaşlanmayı geciktirdiği ve genom stabilizasyonunun korunması için de DNA:RNA hibritleri oluşturduğunu göstermektedir (Wang ve ark, 2015).

TERRA genom stabilitesini telomeraz aktivitesine etki ederek telomer uzunluğunu ve bağlantılı olduğu heterokromatinizasyonu düzenleyerek yapar. TERRA bu fonksiyonlarını yerine getirebilmek için öncelikle subtelomer bölgelerinden transkribe olur ve tekrar genler arası bölgelere ve telomer bölgelerine hibridize olur (Stoller, 2016). TERRA'nın ekspresyon seviyesindeki değişimler direkt olarak telomer uzunluğunun regülasyonu ile ilişkilidir. Bu bağlamda hem transkribe olan hem de transkribe olduktan sonra tekrar telomer bölgelerine hibridize olan TERRA seviyesindeki değişiklikler genom stabilizasyonunda kararsızlıklar, hücre çoğalmasında döngünün kontrol edilememesi ve buna bağlı olarak yaşlanma etkilerinin artması gibi durumların habercisidir (Şekil 4) (Wang, Zhao ve Lu, 2015).

TERRA, guanin açısından zengin tekrarları (memelilerde UUAGGG) içeren RNA molekülleri içerir. Uzunlukları 100 baz ila 9 kilobaz arasında değişiklik gösterir (Arora, Brun ve Azzalin, 2011). 37 ve 39 baz çiftinin CpG bakımından zengin tandem tekrarlarını içeren insan TERRA promoterleri insanların subtelomerlerinin yaklaşık olarak yarısında bulunur (Blackburn, 1994). Deneysel kanıtlar DNA'ya bağımlı RNA Pol II'nin, TERRA biyosentezinde etkin rol oynadığını göstermektedir (Arora, Brun ve Azzalin, 2011).



**Şekil 4.** TERRA'nın Telomerler Üzerinde Regülasyonu (Roake ve Artandi, 2017)

TERRA'lar transkribe edildikten sonra tekrar telomer bölgelerine hibridize olurlar. Burada DNA:RNA hibritleri oluşturarak fonksiyonlarını yerine getirirler. Normal durumda replikasyondan önce TERRA subtelomer bölgelerinden transkribe olur ve hücre döngüsünün erken S evresinde TERRA telomerde birikir ve daha sonra telomerik DNA yoluyla DNA replikasyonunun geç S evresinde kısmi olarak uzaklaştırılır. Bu uzaklaştırma Ribonükleaz H2'nin (RNase H2) aktivasyonu ile yapılır. Özellikle eğer replikasyon öncesinde hibridize TERRA'ların bölgeden kaldırılamaması replikasyon stresi oluşturur ve bu durum genomik stabilizasyonun bozulmasının ya da DNA hasarının habercisi olabilir. Genellikle literatürde herhangi bir stres maruziyetinde kısalan telomerlerin artan hibrit-TERRA miktarı ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Graf ve ark, 2017).

TERRA R-loopların hücre döngüsü kontrolünden bağımsız olarak kısa telomerlerde biriktiği görülmektedir. TERRA'lar, RNase H2 telomer proteini RIF2 tarafından uzun telomerlere alınır, ancak TERRA R-loop yıkımı RNase H2'nin kısa telomerlere almaması ile gerçekleşmektedir (Şekil 4). RNase H2'nin uzun telomerlerde telomerik proteinler tarafından alınması, TERRA R-loop birikimini sınırlar, ancak telomerler kısaltıldığında RNase H2 azalır, bu da önemli bir geri bildirim mekanizmasını ortaya çıkarır. Kısa telomerlerde önemli derecede artan TERRA seviyesi, sonrasında telomerleri uzatabilen ve mayadaki yaşlanma sürecini yavaşlatabilen homoloji odaklı onarımı teşvik edebilir (Roake ve Artandi, 2017).

TERRA'nın telomerlerde tükenmesi, daha büyük DNA hasarına ve kromozomal füzyonlara neden olur. Bulgular, TERRA'nın bir telomer koruyucu düzenleyici ve ayrıca genom çapında bir transkripsiyon düzenleyici olarak işlev gördüğünü göstermektedir (Balk ve ark, 2013). TERRA, telomer uzunluğu için sensörler sunar ve telomerlere R-döngüleri şeklinde bağlanarak kritik derecede kısa telomerlerde telomer uzamasına yol açan süreçleri başlatır. TERRA, kromatine bağlanır ve potansiyel olarak protein kofaktörlerinin yardımıyla genomun başka yerlerinde hedef genlerin ekspresyonunu kontrol eder (Roake ve Artandi, 2017).

## 2.4. TERRA'nın Fonksiyonunu Yerine Getirebilmesi İçin Gerekli Olan ve DNA Hasar Cevabında Rol Oynayan Genler: *Rad51*, *Exo1*, *Rb1*, *RNase H1* ve *RNase H2*

### 2.4.1. *Rad51*

Homolog rekombinasyon (HR) yoluyla DNA onarımında önemli bir adım olan homolog iplik değişiminde önemli bir rol oynar. Tek ve çift sarmallı DNA'ya bağlanır ve DNA'ya bağımlı ATPaz aktivitesi sergiler. İşlenmiş bir DNA kırılması ile onarım şablonu arasında ortak bir molekül oluşturmak için homolog DNA ortakları arasındaki homoloji ve iplik değişiminin tanınmasını katalize eder (Inano ve ark, 2017).

Ayrıca TERRA'nın tam fonksiyonel olması için telomer uçlarına hibridize olması gerekmektedir. TERRA'ların telomer bölgesinde toplanma ve R-döngülerinin oluşumu süreci Rad51 (Rad51 recombinase) proteinine ve 5'-UUAGGG-3' tekrarlarına bağlıdır. Feretzaki ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları çalışmada RAD51'in TERRA'nın R-loop formasyonuna doğrudan iştirak ettiği, Rad51 l'in TERRA'ya güçlü bir şekilde bağlandığı ve TERRA'nın in vitro ortamda telomerik dizilere bağlanmasını katalize ettiğini, yani Rad51 TERRA'nın DNA:RNA hibrit formasyonu için elzem olduğunu göstermiştir (Feretzaki ve ark, 2020).

### 2.4.2. *Exonuclease 1 (Exo1)*

*Exo1* 5'→3' eksonükleaz, hücre döngüsü kontrol noktalarının düzenlenmesine, replikasyon çatalı bakımına ve replikatif DNA onarım yollarının düzenlenmesine katkıda bulunur. Bu işlemler, replikasyon stresine ve replikasyon çatalının olası çökmesine yol açabilecek durmuş veya bloke edilmiş DNA replikasyonunun onarımı için gereklidir. DNA replikasyon sürecinin yeniden başlatılmaması, çift zincir kopmalarına, hücre döngüsü durmasına, hücre ölümüne veya hücrel transformasyona neden olabilir (Keijzers ve ark, 2018).

Telomer tandem tekrarındaki (TTAGGG) üçlü guanin akışı nedeniyle, telomerik DNA birbirini üstüne katlanma konusunda yüksek bir eğilime sahiptir ve G-quadruplexler replikasyon makinesine açık bir şekilde engel teşkil etmektedir. Bu nedenle bu bölgelerin uygun şekilde açılması ve çoğaltılması telomer bütünlüğü ve genomik stabilitenin sağlanması için çok büyük önem arz etmektedir. Kendilerine özgü replikasyon güçlüklerinin üstesinden gelmek için telomerler, replikasyon çatalında oluşan ikincil yapıları çözmek ve doğru replikasyonunu sağlamak için birçok helikaz ve nükleaz birlikte kompleks oluşturarak görev yapar. *Exo1* geni 5'→3' eksonükleaz ve

RNase H aktivitesine sahip bir proteini kodlar ve telomeraz aktivitesinin azaldığı hücrelerde telomerlerin korunmasında önemli rol oynar (Stroik ve ark, 2020). Ayrıca *Exo1*, DNA/RNA hibriti üzerinde RNA'yı parçalayan endonükleaz aktivitesine de sahiptir (Qiu ve ark, 1999).

#### **2.4.3 Retinoblastoma Transcriptional Corepressor 1 (Rb1)**

Tümör baskılayıcı gen Rb1'in osteoblastik hücrelerde telomer bütünlüğünün korunması için gerekli olduğu ve *Rb1*'in heterozigot mutasyonu, fare osteoblastlarında telomer instabilitesini tetikleyerek genomik kararsızlığa yol açtığı gösterilmiştir. Genel olarak, Rb1'in telomerlerin kondensasyon sürecini hem genetik hem de epigenetik olarak düzenlediği bildirilmiştir. Gonzalez ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada Rb1'in, TERRA transkript seviyelerinin modülasyonunun doğrudan düzenlenmesi yoluyla telomerik bütünlüğü etkilediği ve sonuçta telomer mimarisinin yapılandırılmasıyla sonuçlandığını göstermiştir (Gonzalez-Vasconcellos ve ark, 2017).

#### **2.4.4 Ribonükleaz H 1/2 (RNase H1/ RNase H2)**

Ribonükleaz H (RNase H) DNA:RNA hibritlerinden RNA'yı spesifik olarak indirgeyen bir enzimdir. DNA:RNA hibritleri DNA'da çift iplik kırıklarına karşı (DSB) tekrarlayan DNA bölgelerini korumak için gereklidir. DNA:RNA hibritlerinin RNase H enzimleri tarafından bozulması, genomik stabilitenin korunması için önemlidir. 1969'daki keşfinden bu yana, enzim, katalitik mekanizması ve fizyolojik rolü için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. RNase H, Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere iki ana ailede sınıflandırılmıştır. Tip 1 enzimler, prokaryotlarda RNase HI ve ökaryotlarda RNase H1 olarak adlandırılırken, Tip 2 enzimler, prokaryotlarda RNase HII ve ökaryotlarda RNase H2 olarak adlandırılır. RNase H2, hem R-loop işleme hem de ribonükleotit eksizyon onarımı için G2/M'de temel bir işleve sahip olması bakımından sıkı hücre döngüsü düzenleme gereksinimlerine sahiptir. Bununla birlikte RNase H1, R-döngülerini çıkarmak için hücre döngüsünden bağımsız olarak işlev görebilir ve yüksek R-döngü yüklerine yanıt olarak aktif hale gelebilmektedir (Lockhart ve ark, 2019) .

Son çalışmalar, RNase H2'nin, genomik DNA'ya gömülü tek bir ribonükleotidin eksizyonunda ve hücrelerde oluşan bir R halkasının çıkarılmasında rol oynadığını göstermiştir (Kojima ve ark, 2018). R döngüleri, transkripsiyon ve DNA replikasyonunu bloke edebildiklerinden, replikatif strese ve DSB'lerin oluşumuna neden olduklarından genom bütünlüğünün korunması için oldukça zararlıdır. RNase H2, DSB'nin onarımı ve

R-ilmeklerinin çıkarılması dahil olmak üzere çeşitli hücrel olaylarda önemli bir rol oynar (Kojima ve ark, 2018). Bu ilmekler RNase H kusurlu olduğu için çıkarılamadığında replikasyon çatalının ilerlemesini engelleyerek, tek ve çift zincirli DNA kırılmalarını indükleyebilir. Memeli embriyoları, RNase H1 veya RNase H2 yokluğunda gelişimlerini tamamlayamazlar ve bu nedenle her iki enzim de embriyogenez sürecinde gereklidir (Cerritelli ve Crouch, 2019) .

## **2.5. Çevresel Faktörlerin Sperm Genomu Üzerine Etkisi**

Memeli hücrelerinin birtakım çevresel streslere ya da farklı faktörlere maruz kalması sperm genomunun yeniden regülasyonuna (epimutasyonlar) neden olarak, devam eden nesillerde yavruların gelişimsel durumlarını değiştirebilir (Bohacek ve Rassoulzadegan, 2020).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, germ hücreleri üzerinden baba yaşam öyküsünün, çocuğun metabolik ve nöropsikiyatrik hastalıklar dahil olmak üzere artan karmaşık bozukluk riskine yatkın hale getirdiği öne sürülmektedir. Özellikle son birkaç yılda invitro fertilizasyon ve germ hücre hattında, birtakım çevresel faktörlerin yavruların fenotipini etkileyebileceğini kanıtlamak için yapılan çalışmalarda sperm-RNA'larının, babadan edinilen bilgileri yavrulara taşıyan vektörler olduğu ortaya çıkmıştır. Yapılan bir çalışmada da sperm RNA'larının, yavruların gelişimini ve sağlığını doğrudan etkileyebileceği gösterilmiştir (Gapp ve Bohacek, 2018). Daha sonra yapılan çalışmalarda da endokrin bozucular, kronik stres veya diyet gibi çeşitli çevresel faktörlerin sperm hücrelerindeki küçük kodlamayan RNA'ların bileşimini değiştirdiği gösterilmiştir (Bohacek ve Rassoulzadegan, 2020).

Çevresel faktörlerin sperm RNA komponentini yani epigenetik kalıtımı değiştirdiğini gösteren ilk veriler Katharina Gapp ve arkadaşlarının laboratuvarından gelmiştir (Gapp ve ark, 2014). Bu çalışmada erken yaştaki travmatik stresin, spermde birkaç miRNA ve piRNA kümesinde uzun süreli değişikliklere neden olduğunu ve çocukta stresle başa çıkma davranışlarında, metabolizmada ve stres kaynaklı glikoz salınımında karmaşık değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca izole ettikleri total sperm RNA'sının döllenmiş oositlerine enjeksiyonu sonucunda spermdeki bu değişikliklerin çocukta fenokopi etkisi yarattığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, Christopher

Morgan'ın grubu, ergen ve yetişkinlerin kronik strese maruz kalmasının sperm RNA profilini değiştirdiğini ve belirlenen miRNA'lardan dokuzunun intra-zigotik enjeksiyonunun zigottaki birkaç hedef mRNA'nın ekspresyonunu azalttığı ve yetişkinlikte körelmiş HPA aksının aktivasyonunu indüklediğini göstermişlerdir (Morgan ve ark, 2020).

David Dickson grubunun çalışmasında da kronik erken yaşam stresine maruz kalan farelerin spermelerinde miR-499/34 ailesinin birden fazla üyesinde değişiklikler olduğu tespit edilmiş ve aynı miRNA'ların, istismar öyküsü olan insanların spermelerinde de değiştiği gösterilmiştir. Ek olarak, daha da önemlisi farelerde spermde tespit edilen bu miRNA değişikliklerinin çiftleşmeden sonra erken embriyoda da tespit edilebileceğini göstermişlerdir. Bu durum spermdeki bu miRNA değişikliklerinin yavrulara aktarıldığının göstergesidir (Dickson ve ark, 2018).

Farelerde yapılan, çevresel zenginleştirmenin (fizyolojik ve sosyal açıdan uyarıcı ortam) stres kaynaklı bazı etkileri tersine çevirebildiği yani yavruda bu çevresel zenginleştirmenin plastisite ve hafızada kalıtsal bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular orijinal olarak miRNA'larla bağlantılı olmasa da Eva Benito'nun laboratuvarından yapılan son çalışma, çevresel zenginleşmenin yavrularda hafıza ve sinaptik plastisite üzerindeki artırıcı etkisinin, döllenmiş oositlere total sperm RNA enjeksiyonu ile de artırıldığını göstermiştir. Bu etkinin, çevresel zenginleştirme sonrasında sperm ve beyinde up regüle olan miRNA kümesinin kendi inhibitörleri olan miR-212/132 ile birlikte enjekte edilmesiyle de engellenebileceğini göstermiştir (Arai ve ark, 2009; Benito ve ark, 2018; Bohacek ve ark, 2015, 2018; Gapp ve ark, 2016).

Stres faktöründen bağımsız olarak, Valérie Grandjean ve ekibi, yüksek yağlı/şekerli diyetin, yavrularda metabolik fenotipi indüklediğini, yüksek yağlı diyetle maruz kalan erkek farelerin sperminden veya testisinden izole edilen total RNA'nın döllenmiş oosite enjeksiyonunun da fenokopiye neden olduğunu ve spermde tespit edilen tek bir miRNA'nın (miR-19) enjeksiyonunun bile metabolik fenotipi kısmen yeniden ürettiğini göstermiştir (Chen ve ark, 2016; Gapp ve ark, 2014; Grandjean ve ark, 2015; Rodgers ve ark, 2015; Sharma ve ark, 2016).

Anne, hamilelik boyunca yavrunun gelişimi korumaktan sorumludur. Anne yumurtası yavrulara genetik özellikler bakımından yüksek bir yatırımı temsil etmektedir. Tersine, onlarca yıldır spermin pasif bir genetik bilgi donörü olduğu ve yavrularının gelişimsel yörüngelerini değiştirmede sınırlı bir role sahip olduğu düşünülmüştür (Hehar ve ark, 2017; Weinstock 2008).

Oogenezden farklı olarak spermatogenez, ergenlik çağında başlayan ve bir erkeğin yaşamı boyunca devam eden bir süreçtir. Bu nedenle birtakım çevresel etkenlerin sperm genomunu farklı şekilde etkileyeceği kesindir. Epigenetik modifikasyonlar, sıkı bir şekilde gen ifadesini düzenleyen böylece fizyolojik süreçleri ve davranışları etkileyen kuşaklararası bilgi iletimini sağlayan önemli bir modülatördür. Spermatogenez sürecinde epigenetik modifikasyonlar; örneğin DNA metilasyonu korunur ve metil etiketlerdeki değişiklikler sperm gelişimi boyunca gerçekleşir. Çevresel faktörler, sperm oluşumunda epigenetik faktörleri; histon modifikasyonları, metilasyon değişiklikleri ve ayrıca spermde bulunan kodlanmayan RNA'ların türü ve miktarını etkileyebilmektedir. Gelişmekte olan bir organizmadaki çeşitli mekanizmalarda meydana gelen bu değişiklikler moleküler yollarda uzun vadeli değişikliklere katkıda bulunabilir. Sperm babaya ait deneyimlerin yavrularına genotipik varyasyon olarak aktarılması için bir kanal sağlar (Casas ve Vavouri 2014; Hehar ve ark, 2017). Bununla birlikte, epigenetik mekanizmalara ve babaya ait kalıtıma ilişkin ortaya çıkan kanıtlar, bu varsayımı doğrulamıştır. Spermin, yavru gen ifadesinde değişikliklere yol açma potansiyeline sahip bilgileri taşıyabileceğini ve sonuç olarak spermin fenotipi oositlerden daha fazla etkileyebileceği gösterilmiştir. (Bohacek ve Rassoulzadegan 2020).

Literatürde TBH'nın sperm hücrelerindeki telomerler üzerine etkisi olup olmadığını araştıran Harleen Hehar ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları sadece bir çalışma vardır. Bu çalışmada sadece TBH'nın etkisi araştırılmamış, yüksek yağlı diyet, yaşlı baba ve kontrol grubu olarak üç farklı grup oluşturmuşlar ve babanın yaşının ve beslenme biçiminin yavru fenotipini etkilediğini, aynı zamanda, belirli genlerin DNA metilasyonunu değiştirerek TBH sonrası bireysel farklılıklara aracılık ettiğini göstermişlerdir. Sperm telomer uzunluğu açısından fark tespit edemeseler de tek sefer uygulanan TBH'nın spermde, *Beyinden türetilen nörotrofik faktör (Bdnf)*, *Leptin reseptör (Lept-R)*, *Oksitosin reseptör (Oxy-R)*, *Telomeraz reverse transkriptaz (Tert)*,

*İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 (Igf2) ve İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 reseptörü (Igf2-R) genlerinin promotor metilasyonunda değişiklik meydana getirdiğini fakat sadece Bdnf geni promoter DNA metilasyon değişikliğin anlamlı olduğunu göstermişlerdir (Hehar ve ark, 2017).*



### 3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan izin alınarak (Karar No: 21/18) Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi Transgenik biriminde mevcut olan *Balb/C* ırkı fareler erkek fareler üzerinde yapılmıştır. Moleküler çalışmalar ise Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi Genom biriminde gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1 GEREÇLER

##### 3.1.1 Sarf Malzemeler

PureZOL™ RNA Isolation Reagent (Bio-Rad, 7326890, ABD), Amonyum Asetat (Sigma, A1542-500G, Almanya), Tris (Sigma,1503, Almanya), EDTA (Sigma, E5134, Almanya), SDS (Sigma, L3771, Almanya), DNase I Recombinant (Roche, 4716728001, Almanya), EvoScript Universal cDNA Master (Roche, 7912374001, Almanya), LightCycler 480 Syber Green II Master (Roche, 4707516001, Almanya), Telomer Primer F (IDT, ABD), Telomer Primer R (IDT, ABD), 36B4 primer R (IDT, ABD) 36B4 primer R (IDT, ABD), Telomer Standart (IDT, ABD), 36B4 Standart (IDT, ABD), GAPDH Primer (IDT, ABD), Rad51, Exo1, Rb1, RNase H1 ve RNase H2a (Sentebiolab), PGL3 Basic Vektör (Promega, E1751, ABD), LightCycler 480 96-Multiwell Plate (Roche, 04729692001, Almanya).

##### 3.1.2 Demirbaş Malzemeler

Gilson mikropipet seti, Sigma santrifüj cihazı, Sensquest Labcycler PCR cihazı, Roche LightCycler® 480 II cihazı, Nikon Ti Eclipse floresan mikroskop, Heidolph Vortex cihazı, Gilson GmcLab Spin, Shimadzu-Biotech Bio-Spec Nano Spectrophotometer, Siemens -20 °C buzdolabı, Siemens -80°C dolap.

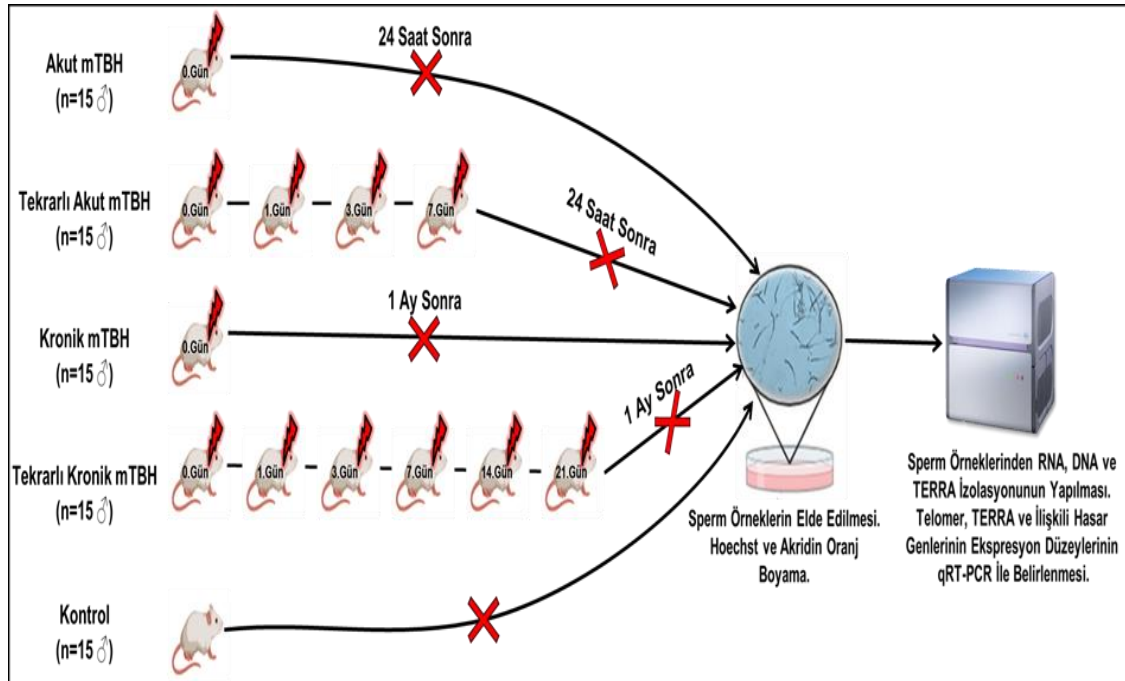
### 3.2 YÖNTEMLER

Bu çalışmada Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi, transgenik departmanında yetiştirilen 2 aylık, ortalama 30-40 gr ağırlığındaki, *Balb/C* ırkı erkek fareler kullanılmıştır. Bu projede kullanılan hayvanlar  $20 \pm 2$  °C sıcaklık,  $52 \pm 3$  nem, on ikişer saatlik aydınlık/karanlık ortamda tutulmuş, standart pelet fare yemi ile beslenmiş ve haftalık olarak altlıkları değiştirilerek suya serbestçe ulaşabilmelerine olanak sağlanmıştır.

Toplamda 1 hayvan türünde 5 farklı grup oluşturulmuştur.

Bu gruplar;

1. Tek sefer mTBI oluşturulmuş akut grup (TBH'dan 24 saat sonra) (grup 1),
2. Tek sefer mTBI oluşturulmuş kronik grup (TBH'dan 30 gün sonra) (grup 2),
3. Tekrarlı mTBH (r-mTBH) oluşturulmuş akut grup (Son TBH'dan 24 saat sonra) (grup 3),
4. r-mTBH oluşturulmuş kronik grup (Son TBH'dan 30 gün sonra) (grup 4) ve
5. Herhangi bir işlem yapılmamış olan kontrol grubu (grup 5) olarak planlanmıştır.

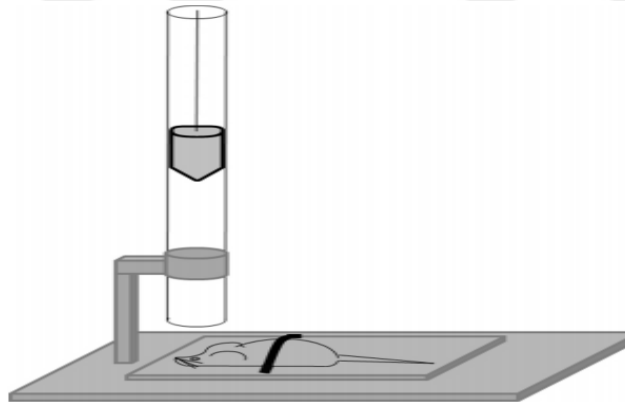


Şekil 5. Tez çalışmasının şematik olarak gösterimi

### 3.2.1 TBH Fare Modelinin Oluşturulması

Erkek *Balb/C* fareler 2 aylık olduklarında Marmarou ve arkadaşlarının travma modeline göre farelerde kafa travması oluşturulmuştur (Marmarou ve ark, 1994). Bu kafa travması modeline göre travma öncesi farelere genel anestezi yapmak için 150µl %2 Rompun (Bayer, Amerika) ve 150 µl Ketalar (Pfizer, Amerika) 2ml %0,9 NaCl içinde çözülerek hazırlanmış ve hazırlanan bu anestezik çözelti farelere 10 ml/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir (Marmarou ve ark, 1994).

Genel anestezinin derinliği pedal refleksi ile kontrol edilmiştir. Fare anestezi altında girdikten sonra lokal olarak acıyı en aza indirmek için kafa derisine subkutan lokal anestezi olarak etken maddesi bupivakain hidroklorür olan Buvicaine %0,5 (Polifarma, Türkiye) enjeksiyonluk çözeltiden 100µl uygulanmıştır. Hafif şiddetli travma oluşturmak için, anestezi altındaki farenin kafa derisi bisturi yardımıyla açılmış ve hazırlanmış olan Marmarou travma aleti üzerine (Şekil 4) fare yerleştirilmiştir. Marmarou travma aleti 80 cm'lik bir boru ve altında farenin yatırıldığı alandan oluşmaktadır (Marmarou ve ark, 1994).



**Şekil 6.** Marmarou travma aleti

Anestezi altında farenin cerrahi işlem ile derisi açılmış kafasının üzerine plastik bir disk koyularak bu borunun altına yerleştirilmiştir. Daha sonra borunun en üst tepe kısmı olan 80 cm'lik yükseklikten farenin kafatasına 30 gr' lık ağırlık bırakılmıştır (Marmarou ve ark, 1994).

Travma sonrası farenin açılan kafa derisi sütür (Surgisorb, İngiltere) ile dikilerek farenin fiziksel yaşamsal bulguları; solunum ve hareketlilik gözlemlenmiştir. Yaşamsal bulgularını normale dönen fare barınma koşullarına alınmıştır. Barınma koşullarında dört saat boyunca içme suyuna 1-2 mg/ml olacak şekilde paretamol eklenmiştir.

### **Deney hayvan gruplarının TBH modelindeki travma sıklığı:**

- Akut hafif şiddetli kafa travması (mTBH) grubunda bir kez TBH oluşturduktan 24 saat sonra,
- Kronik hafif şiddetli kafa travması (mTBH) grubunda bir kez TBH oluşturduktan 30 gün sonra,
- Akut tekrarlı hafif şiddetli kafa travması (r-mTBH) grubunda 0, 1, 3. ve 7. günlerde TBH oluşturduktan 24 saat sonra,
- Kronik tekrarlı orta şiddetli kafa travması (r-mTBH) grubunda 0, 1, 3, 7, 14. ve 21. günlerde TBH oluşturduktan 30 gün sonra,
- Kontrol grubun ise herhangi bir işlem yapılmamıştır.

Yukarıda belirtilen gruplar için travma süreleri sona erdiğinde; 150µl %2 Rompun ve 150 µl Ketalar 2ml %0,9 NaCl içinde çözülerek hazırlanmış ve hazırlanan bu anesteziik çözelti her fare için 10 ml/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Fareler genel anestezi altına girdikten sonra servikal dislokasyon yöntemiyle en acısız şekilde sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen farelerin sperm örnekleri Vas Deferans kanalından içerisinde PBS bulunan petri kabı içerisine alınmıştır.

Telomer uzunluğu hesaplanması için sperm hücrelerinden elde edilen DNA örneklerinde telomer uzunlukları uygun primer ve standartlar kullanılarak RT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen DNA:RNA hibrit ve total RNA örneklerinden ise farklı kromozom bölgelerinden ifade edilen uzun kodlanmayan RNA olan TERRA transkriptlerinin bağlanma ve ekspresyon düzeyleri; TERRA ve DNA hasarı ilişkili olan; *Rad51*, *Exo1*, *Rb1*, *RNase H1* ve *RNase H2a* genleri uygun primerler ve standartlar kullanılarak RT-PCR ile belirlenmiştir. Referans gen olarak *Gapdh* geni kullanılmıştır. Elde edilen veriler uygun istatistiksel yöntemler kullanılarak analiz edilmiştir.

### **3.2.2 Sperm Örneklerinde Majör DNA Hasar Analizi**

#### **3.2.2.1. Hoechst Boyama**

Morfolojik DNA hasarını belirlemek için bütün gruplara ait sperm örneklerinde aşağıdaki protokole göre Hoechst boyama yapılmıştır. Hoechst boyama, hücrelerde morfolojik olarak apoptotik değişim olup olmadığını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (Foote ve ark,1998; Kim ve ark, 1988).

TBH modeli oluşturulan fareler deney süreleri tamamlandıktan sonra sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen farelerin Vas Deferans kanalından sperm sağımı yapılmıştır.

Sperm örnekleri 15 ml'lik falkon tüpe alınmıştır. Falkon tüp içerisindeki sperm örnekleri 5 dakika karıştırıcıda karıştırılmıştır. Falkon tüp 1000 rpm'de 2 dk +4 °C'de santrifüj edilmiş süpernatant yeni falkona alınmıştır. Falkon içerisinde olan sperm örneğinden 10 µl alınarak Thoma Lamında sperm sayımı yapılmıştır. Sperm sayım sonucu mililitrede 800.000-1.000.000 adet sperm olacak şekilde 1.5 ml'lik ependorfa alınacaktır. Yeni tüpe alınan sperm 4000 rpm'de 5 dk +24 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atılmış 500 µl %4 paraformaldehit eklenmiştir. Karanlıkta oda sıcaklığında bir saat fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından 4000 rpm'de 5 dk +24 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atılmış 500 µl PBS eklenerek sperm örnekleri yıkanmıştır. Bu işlem iki defa tekrarlanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında süpernatant kısım atılmıştır. Pellet üzerine 100 µl PBS eklenerek sperm örnekleri resüspanse edilmiştir. Resüspanse olan sperm örnekleri lam üzerine yayılarak oda sıcaklığında 30 dakika kurumaya bırakılmıştır. Lam üzerinde kuruyan sperm örnekleri her lam için 200 µl etken maddesi bisBenzimide olan Hoechst boyası (Sigma, Cat. No.861405) ile boyanarak karanlıkta 5 dakika bekletilmiştir. Lam PBS ile yıkanmış Fluorescence Microscope Nikon Ti Eclipse (Nikon, Japonya) 40x objektifte görüntü alınmıştır. Görüntüler alındıktan sonra ImageJ programı kullanılarak hasarlı olan sperm sayısı belirlenerek analiz edilmiştir (Foote ve ark,1998; Kim ve ark, 1988).

### **3.2.2.2. Sperm Örneklerinde Akridin Oranj Boyama**

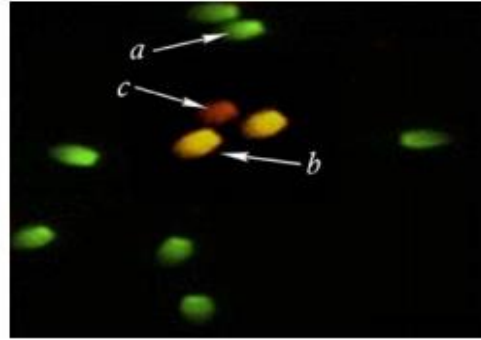
DNA iplik kırıkları olup olmadığını belirlemek için bütün gruplara ait sperm örneklerine akridin oranj boyama yapılmıştır.

Sperm sayım sonucu mililitrede 800.000-1.000.000 adet sperm olacak şekilde 1.5 ml'lik ependorfa alınmıştır. Yeni tüpe alınan sperm örnekleri 4000 rpm'de 5 dk +24 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atılmış 500 µl PBS eklenerek sperm örnekleri yıkanmıştır. Bu işlem iki defa tekrarlanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında süpernatant kısım alınmıştır. Pellet üzerine 100 µl PBS eklenerek sperm örnekleri resüspanse edilmiştir. Resüspanse olan sperm örnekleri lam üzerine yayılarak oda sıcaklığında 20 dakika kurumaya bırakılmıştır. Lam üzerinde kuruyan sperm örnekleri her lam için 200 µl Carnoys solüsyonu (3:1 oranında metanol: glisial asetik asit) ile lam yüzeyi kaplanarak fikse edilmiştir. Sperm örnekleri bulunan lamlar oda sıcaklığında 2 saat kurumaya bırakılmıştır.

### Sperm örneklerini boyamak için;

- 10 ml Akridin Oranj (Merck, Cat.No.24854106, ABD)
- 40 ml 0.1M Sitrik asit (Merck, Cat.No.77-92-9, ABD)
- 2.5 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma, Cat.No.7782-85-6, ABD) kullanılarak boyama solüsyonu oluşturulmuştur (Tejada ve ark, 1984).

Kuruyan lam üzerine 200  $\mu\text{l}$  boyama solüsyonu eklenerek boyanmış ve karanlıkta 5 dakika bekletilmiştir. Lam PBS ile yıkanmış Fluorescence Microscope Nikon Ti Eclipse (Nikon, Japonya) 40x objektifte görüntü alınmıştır. Görüntüler alındıktan sonra İmageJ programı kullanılarak hasarlı olan sperm sayısı belirlenerek analiz edilmiştir (Tejada ve ark, 1984).



**Şekil 7.** Akridin Oranj boyama görüntüsü: (a) normal, (b) orta derecede denatüre ve (c) tamamen denatüre spermatozoa (Kazerooni ve ark, 2009)

### 3.2.3 Sperm Örneklerinden Total RNA İzolasyonu

Sakrifiye edilen farelerin Vas Deferans kanalından sperm sağımı yapılmıştır. Sperm örnekleri 15 ml'lik falkon tüpe alınmıştır. Falkon tüp içerisindeki sperm örnekleri 5 dakika karıştırıcıda karıştırılmıştır. Falkon tüp 1000 rpm'de 2 dk +4 °C'de santrifüj edilmiş süpernatant yeni falkona alınmıştır. Yeni tüpe alınan süpernatant 3000 rpm'de 15 dk +4 °C'de santrifüj edilmiş süpernatant atılmış ve 500  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O eklenip pellet resüspanse edilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 4,5ml PBS eklenerek 3000 rpm'de 15 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 3  $\mu\text{l}$  0.1M DTT (Ditiotreitol) ve 1000  $\mu\text{l}$  Trizol (Bio-Rad, Cat. No. 732-6890, ABD) eklenip 5 dakika buzda bekletilmiştir. Pellet çözeltisi 1.5 ml'lik ependorfa aktarılmış ve 2 ml'lik enjektör ile homojenize edilmiştir. Homojenize olan çözeltiye 200  $\mu\text{l}$  kloroform (Merc,

Cat.No.1024452500, Almanya) eklenmiştir. 12.000 g'de 15 dakika +4 °C 'de santrifüj edilmiştir. Üst aköz faz yeni 1.5ml'lik ependorfa alınmıştır. Süpernatant üzerine 1:1 oranında 2-Propanol (Merc, Cat.No. 1096342511) eklenmiş 30 dakika -20 °C'de bekletilmiştir. İnterfaz ise DNA ve Hibrit DNA izolasyonu için farklı 1.5 ml'lik ependorfa alınmış üzerine 1:1 oranında 2-Propanol eklenmiş 30 dakika -20 °C'de bekletilmiştir. -20 °C'de bekletilen RNA tüpü 12000 g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atılmış 1ml %70 etanol (Merc, Cat.No.1009832511, Almanya) konulmuş 7500 g'de 5 dakika +4°C'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra supernatant dökülmüş ve pellet içerisindeki alkolün uzaklaşması için kurumaya bırakılmıştır. Pellet kuruduktan sonra 30 µl nükleaz free water eklenmiş, pellet resüspanse edilmiştir. Elde edilen RNA'lar buz içerisine alınıp Nano Spektro fotometrede (Shimadzu-Biotech Bio-Spec Nano Spectrophotometer, Japonya) cihazında ölçümü yapılarak konsantrasyonları belirlenmiştir. Konsantrasyonları belirlenen RNA örnekleri çalışma başlayana kadar -80°C'de saklanmıştır (Kianmehr ve ark, 2019; Ozkul ve ark, 2020; Rassoulzadegan ve ark, 2021).

### **3.2.4 Sperm Örneklerinden DNA İzolasyonu**

Total RNA izolasyonunda santrifüj sonrası farklı 1.5 ml'lik ependorfa alınan DNA örneklerinin üzerine 1:1 oranında 2-Propanol eklenen ve 30 dakika -20 °C'de bekletilen DNA örnekleri +4 °C, 12.000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atılmış 1ml %70 etanol konulmuş 7500 g'de 5 dakika +4°C'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra supernatant dökülmüş ve pellet içerisindeki alkolün uzaklaşması için kurumaya bırakılmıştır. Pellet kurutulduktan sonra her bir tüpe içerisinde 1M Tris, %14 SDS, 0.1M EDTA ve 40 µl Proteinaz K bulunan 600 µl Cell Lysis Buffer eklenerek 56°C 'de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bir gece inkübasyondan sonra çözeltinin 300 µl DNA izolasyonu için 300 µl'si DNA:RNA hibrit (TERRA) izolasyonu için iki farklı 1.5 ml'lik ependorfa aktarılmıştır. İki tüpe 100 µl amonyum asetat eklenmiş kısa vorteksin ardından 4000 rpm'de 20 dakika +18°C'de santrifüj yapılmıştır. Üst aköz fazlar yeni 1.5ml'lik ependorfa alınarak süpernatant üzerine 1:1 oranında 2-Propanol eklenmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atılmış 1ml %70 etanol konulmuş 4000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra supernatant dökülmüş ve pellet içerisindeki alkolün uzaklaşması için kurumaya bırakılmıştır. Pellet kurutulduktan sonra DNA izole edilen tüpe 30 µl nükleaz

free water eklenmiş, pellet resüspanse edilmiştir. Elde edilen DNA'lar buz içerisine alınıp Nano Spectrophotometrede cihazında ölçümü yapılarak konsantrasyonları belirlenmiştir. Konsantrasyonları belirlenen DNA örnekleri çalışma başlayana kadar -80°C'de saklanmıştır (Kianmehr ve ark, 2019; Ozkul ve ark, 2020; Rassoulzadegan ve ark, 2021).

### **3.2.5 Sperm Örneklerinden DNA:RNA Hibrit İzolasyonu**

Sperm örneklerinden izole edilen 2 tüp DNA örneğinden birine pellet kurutulduktan sonra üzerine 10 µl DNase (Roche, Cat.No.4716728001, Almanya) ve 90 µl DNase inkübasyon buffer eklenmiş 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 300 µl Trizol ve 180 µl klorofom eklenmiş ve kısa vorteks yapılmıştır. 12.000 g'de 15 dakika +4 °C 'de santrifüj edilmiştir. Üst aköz faz yeni 1.5ml'lik ependorfa alınmıştır. Süpernatant üzerine 1:1 oranında 2-Propanol eklenmiştir. 30 dakika -20 °C'de bekletilmiştir. -20 °C'de bekletilen tüp 12000 g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atılmış 1ml %70 etanol konulmuş 7500 g'de 5 dakika +4°C'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra supernatant dökülmüş ve pellet içerisindeki alkolün uzaklaşması için kurumaya bırakılmıştır. Pellet kurutulduktan sonra izole edilen DNA:RNA hibrit tüpü üzerine 30 µl nükleaz free water eklenmiş, pellet resüspanse edilmiştir. Elde edilen DNA:RNA Hibriti buz içerisine alınıp Nano Spectrophotometrede cihazında ölçümü yapılarak konsantrasyonları belirlenmiştir. Konsantrasyonları belirlenen DNA:RNA Hibrit örnekleri çalışma başlayana kadar -80°C'de saklanmıştır (Kianmehr ve ark, 2019; Ozkul ve ark, 2020; Rassoulzadegan ve ark, 2021).

### **3.2.6 Telomer Uzunluğunun Belirlenmesi**

Spermlerden elde edilen DNA'lar kullanılarak telomer uzunluğunun hesaplanabilmesi için Tablo 1'de verilen telomer standarttı, 36B4 standarttı, telomer primerleri ve 36B4 primerleri kullanılarak Real Time PCR yöntemi ile hesaplanmıştır.

**Tablo 3.** Telomer uzunluklarının belirlenmesinde kullanılan primerlerin sekansları

| Oligomerler    |                  | Tür           | Oligomer sakansı (5'→3')                                                                  | Amplikon büyüklüğü |
|----------------|------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Standartlar    | Telomer standart | Fare (Balb/C) | (TTAGGG) <sub>14</sub>                                                                    | 84 bp              |
|                | 36B4 Standart    | Fare          | ACTGGTCTAGGACCCGAGAAGA<br>CCTCCTTCTTCCAGGCTTTGGGC<br>ATCACCACGAAAATCTCCAGAG<br>GCACCATTGA | 79 bp              |
| PCR Primerleri | Telo F           | Fare          | CGGTTIGTTTGGGTTTGGGTTTG<br>GGTTTGGGTTTGGGTTT                                              | 39 bp              |
|                | Telo R           | Fare          | GGCTTGCCTTACCCTIACCCTTAC<br>CCTTACCCTTACCCT                                               | 39 bp              |
|                | 36B4 F           | Fare          | ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG                                                                     | 21 bp              |
|                | 36B4 R           | Fare          | TCAATGGIGCCICTGGAGATT                                                                     | 21 bp              |

Her bir reaksiyon için stok telomer ve 36B4 standartları Tablo 1 ve Tablo 2' deki gibi sulandırılarak standart serisi oluşturulmuştur.

**Tablo 4.** Telomer standart serisi

| Standart Serisi | Miktar                          | Distile Su (μl) | Telomer sekansı (kb) |
|-----------------|---------------------------------|-----------------|----------------------|
| Standart 1 (S1) | 2 μl Telomer (10 pmol) standart | 18              | $1.18 \times 10^7$   |
| Standart 2 (S2) | 2 μl S1                         | 18              | $1.18 \times 10^6$   |
| Standart 3 (S3) | 2 μl S2                         | 18              | $1.18 \times 10^5$   |
| Standart 4 (S4) | 2 μl S3                         | 18              | $1.18 \times 10^4$   |
| Standart 5 (S5) | 2 μl S4                         | 18              | $1.18 \times 10^3$   |
| Standart 6 (S6) | 2 μl S5                         | 18              | $1.18 \times 10^2$   |

**Tablo 5.** 36B4 standart serisi

| Standart Serisi | Miktar                       | Distile Su (μl) | 36B4 sekansı (kb)  |
|-----------------|------------------------------|-----------------|--------------------|
| Standart 1 (S1) | 2 μl 36B4 (10 pmol) standart | 18              | $2.63 \times 10^8$ |
| Standart 2 (S2) | 2 μl S1                      | 18              | $2.63 \times 10^7$ |
| Standart 3 (S3) | 2 μl S2                      | 18              | $2.63 \times 10^6$ |
| Standart 4 (S4) | 2 μl S3                      | 18              | $2.63 \times 10^5$ |
| Standart 5 (S5) | 2 μl S4                      | 18              | $2.63 \times 10^4$ |
| Standart 6 (S6) | 2 μl S5                      | 18              | $2.63 \times 10^3$ |

Hazırlanan tüm standartlara 1μl pGL3-Basic Vector (Promega, E1751, Fransa) konulmuştur. Standartlar hazırlandıktan sonra telomer ve 36B4 için ayrı ayrı reaksiyon miksi hazırlanmıştır.

### Reaksiyon Miksinin Hazırlanması;

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Sybr Green Master Miks | 10 µl  |
| Primer F               | 0,5 µl |
| PrimerR                | 0,5 µl |
| dH <sub>2</sub> O      | 5 µl   |

Reaksiyon miks hazırladıktan sonra 96 kuyucuklu plate'e her bir örnek için 16 µl miks dağıtılmış ve üzerine 4 µl DNA örneği eklenmiştir. Ardından Roche LightCycler LC480 II (Almanya) cihazında aşağıda verilen PCR koşulları altında reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

| Real Time PCR Programı |       |               |
|------------------------|-------|---------------|
| 95 °C                  | 10 dk | 40 Döngü      |
| 94 °C                  | 20 sn |               |
| 60 °C                  | 20 sn |               |
| 72 °C                  | 45 sn |               |
| 95 °C                  | 15 sn | Melting Curve |
| 67 °C                  | 01 sn |               |
| 95 °C                  |       |               |
| 40 °C                  | 30 sn |               |

PCR sonucunda telomer standartı ve 36B4 standartı için elde edilen Ct değerleri kullanılarak ile standart eğri grafiği çizilmiş Callagan ve arkadaşlarının metodu kullanılarak telomer uzunlukları hesaplanmıştır (O'Callaghan ve Fenech, 2011).

### 3.2.7 Total RNA ve Hibrit DNA:RNA Örneklerinden TERRA Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

#### cDNA Eldesi

Elde edilen Total RNA'lardan ve DNA:RNA hibritlerinden TERRA'nın ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi için cDNA sentezi aşağıdaki protokole göre yapılmıştır. cDNA sentezi için RNA konsantrasyonları 10ng–100ng arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. cDNA sentezi EvoScript cDNA sentez Kit (Roche, Cat.No. 07912374001, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon miks için gerekli olan malzemeler ve her bir örnek için kullanılmış miktarlar aşağıda bulunan tablodaki gibidir.

#### Reaksiyon Miksinin hazırlanması;

|                     | Her bir örnek için |
|---------------------|--------------------|
| Reaction Buffer(5X) | 4 µl               |
| dH <sub>2</sub> O   | 10 µl              |
| RNA                 | 5 µl               |

Hazırlanan miks çok kısa süre vorteksledikten sonra, çok kısa süre spin yapılmıştır. Ardından her bir kuyucuğa 15µl miks mikropipet aracılığı ile dağıtılmış ve daha sonra her bir kuyucuğa 5 µl RNA örneği eklenip 5dk buz üzerinde bekletilmiştir. Bu işlemden sonra ürünler üzerine 2 µl Enzim miks (Reverse Transkriptaz) eklenmiştir. Ardından aşağıdaki programa göre PCR cihazına konulmuştur.

| <b>cDNA PCR Programı</b> |           |
|--------------------------|-----------|
| 42°C                     | 15 dakika |
| 85°C                     | 5 dakika  |
| 65°C                     | 15 dakika |
| 4°C                      | ∞         |

PCR sonunda 20µl cDNA ürünü elde edilmiştir.

### **3.2.8. Total ve Hibrit TERRA Ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR’da Belirlenmesi**

Hem izole edilen total RNA hem de DNA: RNA hibrit RNA örneklerinden elde edilen cDNA örneklerinden ayrı ayrı Roche Light Cycler LC480 II cihazı kullanılarak TERRA ekspresyon seviyeleri LightCycler® 480 SYBR Green I Master kiti (Roche, Cat.No. 04707516001, Almanya) kullanılarak aşağıdaki protokole göre belirlenmiştir.

Aşağıda belirtilen miktarlarda reaksiyon miks’i hazırlanarak her bir örnek için plate kuyucuklarına dağıtılmıştır.

|                        |               |
|------------------------|---------------|
| Sybr Green Master Miks | <b>10 µl</b>  |
| Primer F               | <b>0,5 µl</b> |
| PrimerR                | <b>0,5 µl</b> |
| dH <sub>2</sub> O      | <b>5 µl</b>   |

16 µl miks kuyucuklara dağıtıldıktan sonra 1:5 oranında sulandırılmış 4 µl cDNA örnekleri miksin üzerine eklenmiştir. Ardından şeffaf kapatıcı ile plate’in üzeri kapatılmıştır. Spin yapılarak hava kabarcıkları yok edilmiş ve ardından Roche Light Cycler LC 480 II cihazında Ct değerleri belirlenmiştir. Manipasyondan doğabilecek hataları ekarte etmek için bütün örnekler çift çalışılmıştır. House-Keeping gen olarak *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (Gapdh)* kullanılmıştır. PCR sonunda elde edilen Ct değerleri  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  yöntemi kullanılarak normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001; Rao ve ark, 2013).

### 3.2.9 mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Real Time PCR’da Belirlenmesi

Önceki aşamada total RNA örneklerinden elde edilen cDNA örneklerinden *Rad51*, *Exo1*, *Rb1*, *RNase H1* ve *RNase H2* genlerinin ekspresyon seviyeleri uygun primerler kullanılarak aşağıda verilen ekspresyon çalışma protokolüne göre belirlenmiştir.

**Tablo 6.** Ekspresyonu seviyesi belirlenen genlerin primer sekansları

| Gen Adı         | GenBank Accession |   | Primer sakansı (5'→3') | Ürün Boyutu |
|-----------------|-------------------|---|------------------------|-------------|
| <i>Rad51</i>    | NM_011234         | F | GTCCACAGCCTATTTACGGT   | 94 bp       |
|                 |                   | R | ACAGCCTCCACTGTATGGTAAC |             |
| <i>Exo1</i>     | NM_012012         | F | TTATGGGGTCAAGCCGATTCT  | 95 bp       |
|                 |                   | R | GGTTGCTTTGTCGTCTCTCTC  |             |
| <i>Rb1</i>      | NM_009029         | F | TCGATACCAGTACCAAGGTTGA | 95 bp       |
|                 |                   | R | ACACGTCCGTTCTAATTTGCTG |             |
| <i>RNase H1</i> | NM_011275         | F | TGGTTCAAAAGGGCAGGAAAG  | 163 bp      |
|                 |                   | R | AAATGCGTCCTTGCTCACTAC  |             |
| <i>RNase H2</i> | NM_027187         | F | TCTACGCCATCTGTTACTGCC  | 94 bp       |
|                 |                   | R | TCCCGCTCGTTCTCTGTCAA   |             |
| <i>Gapdh</i>    | NC_000072.7       | F | GTGTTCTACCCCAATGTG     | 259 bp      |
|                 |                   | R | GTCATTGAGAGCAATGCCAG   |             |
|                 |                   | R | TGGAACGCTTCACGAATTTGCG |             |

cDNA örneklerinde Roche Light Cycler LC480 II cihazı kullanılarak genlerin ekspresyon seviyeleri LightCycler® 480 SYBR Green I Master kiti (Roche, Cat.No. 04707516001, Almanya) kullanılarak aşağıdaki protokole göre belirlenmiştir. Aşağıda belirtilen miktarlarda reaksiyon miksi hazırlanarak her bir örnek için plate kuyucuklarına dağıtılmıştır.

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Sybr Green Master Miks | 10 µl  |
| Primer F               | 0,5 µl |
| PrimerR                | 0,5 µl |
| dH <sub>2</sub> O      | 5 µl   |

16 µl miks kuyucuklara dağıtıldıktan sonra 1:5 oranında sulandırılmış 4 µl cDNA örnekleri miksin üzerine eklenmiştir. Ardından şeffaf kapatıcı ile plate'in üzeri kapatılmıştır. Spin yapılarak hava kabarcıkları yok edilmiş ve ardından Roche Light Cycler LC 480 II cihazında Ct değerleri belirlenmiştir. Manipasyondan doğabilecek

hataları ekarte etmek için bütün örnekler çift çalışılmıştır. House-Keeping gen olarak *Gapdh* kullanılmıştır. PCR sonunda elde edilen CT değerleri  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemi kullanılarak normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001; Rao ve ark, 2013).

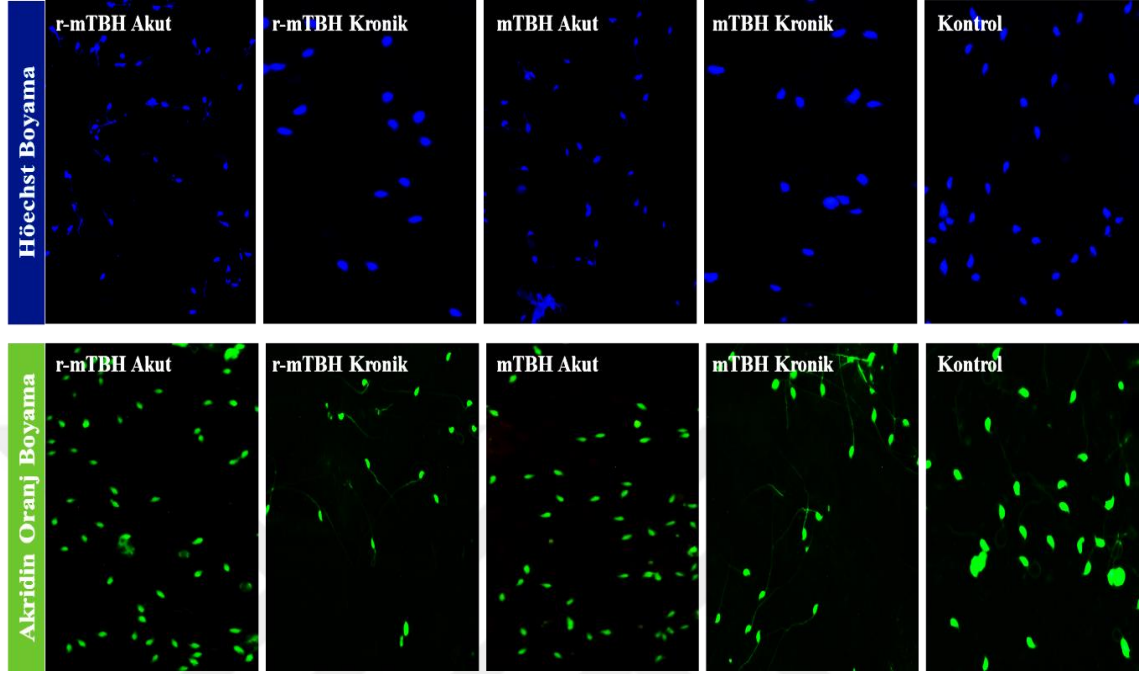
### 3.3 İstatistiksel Analiz:

Sonuçlar elde edildikten sonra deney grupları ve kontrol grupları arasında karşılaştırmalar yapılmıştır. Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Verilerin normal dağılım gösterip göstermemesine bağlı olarak, One Way ANOVA, Kruskal Walls, student t-test ve Mann Whitney-U testi ile Pearson ve Spearman testleriyle korelasyon analizleri yapılmıştır. Verilerin SPSS versiyon 22 (IBM, ABD) ve Graph-Pad Prism 8 yazılımı kullanılarak analizleri gerçekleştirilmiştir. p değerleri <0,05 olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Taheri ve ark, 2021).

#### 4. BULGULAR

Planlanan projede 2 aylık erkek *Balb/C* farelere Marmaroau travma aleti kullanarak hafif TBH (mTBI) ve tekrarlı hafif TBH (r-mTBH) fare modeli oluşturulmuş ve TBH'dan sonra akut ve kronik dönemde travmaya maruz kalan farelerin sperm hücrelerinde öncelikle H  chst ve Akridin Orange boyamalarıyla DNA hasar analizi yapılmıştır. Ayrıca gruplara ait sperm DNA örneklerinde telomer uzunlukları; total RNA ve DNA:RNA hibrit örneklerinde TERRA ekspresyon seviyeleri; Total RNA örneklerinde, telomer uzunluğu ve DNA hasar cevabının regülasyonunda görevli *Rad51*, *Exo1*, *Rb1*, *RNase H1* ve *RNase H2* genlerinin transkript seviyeleri belirlenmiştir.

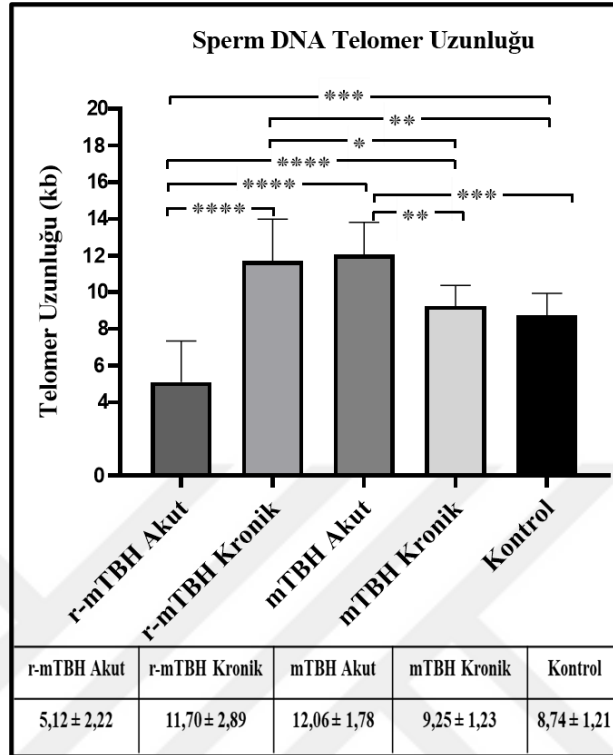
#### 4.1. TBH'ndan Sonra Sperm Hücrelerinde Hoechst ve Akridin Oranj Boyama Sonuçları



**Şekil 8.** TBH'dan sonra r-mTBH akut, r-mTBH kronik, mTBH akut, mTBH kronik ve kontrol gruplarının sperm hücrelerinde Hoechst ve Akridin Oranj boyama sonuçları

TBH'nın sperm hücrelerinde major bir DNA hasarı oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacıyla mTBH akut, mTBH kronik, r-mTBH akut, r-mTBH kronik ve kontrol gruplarında her gruptan 5 farenin sperm örneklerinde Hoechst ve Akridin Oranj boyama yapılmıştır. Her örnek için 10 farklı alandan görüntü alınmıştır. 10 farklı alandan alınan görüntülerde ortalama 300 sperm hücresi sayılmış ve TBH sonrası sperm hücrelerinde majör bir DNA hasar olup olmadığına bakılmıştır. Hoechst ve Akridin Oranj boyama sonrası yapılan analizler sonucunda oluşturulan TBH gruplarının sperm örneklerinde herhangi bir majör DNA hasar görüntüsüne rastlanmamıştır.

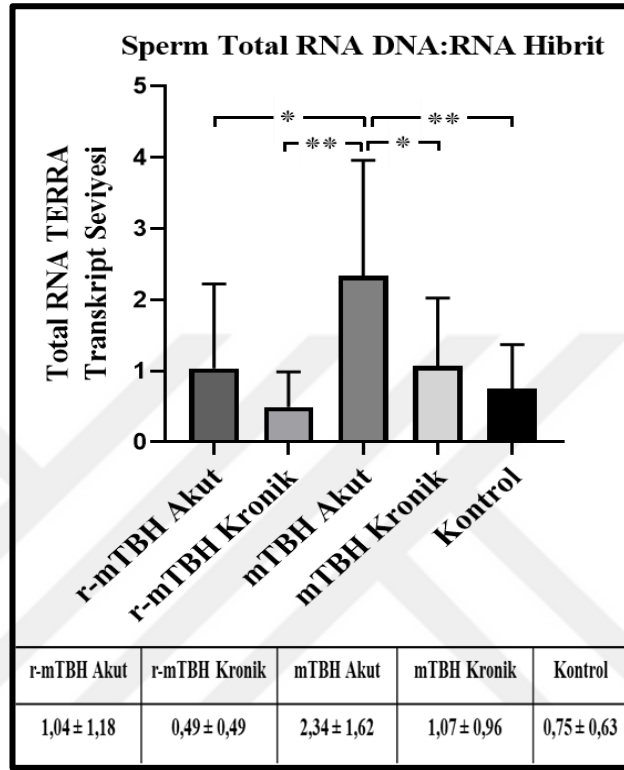
#### 4.2. mTBH ve r-mTBH'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait Sperm Hücrelerinde Telomer uzunlukları



**Şekil 9.** mTBH ve r-mTBH gruplarına ait sperm hücrelerindeki telomer uzunluklarının gruplar arasında karşılaştırılması (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ )

r-mTBH akut, r-mTBH kronik, mTBH akut, mTBH kronik TBH grupları ve kontrol grubu oluşturulduktan sonra farelerden alınan sperm örneklerinden elde edilen DNA örneklerinde telomer uzunluklarını belirlenmiştir (Şekil 9). Akut ve kronik fazda mTBH ve r-mTBH gruplarına ait sperm örneklerinin telomer uzunlukları kontrol grubuyla kıyaslandığında; r-mTBH akut ( $p < 0,001$ ) grubunun telomer uzunluğun kontrol grubuna göre kısaldığı tespit edilmiştir. r-mTBH kronik ( $p \leq 0,0001$ ) ve mTBH akut ( $p < 0,001$ ) grubun telomer uzunluğun da kontrol grubuna göre arttığı tespit edilmiştir. mTBH kronik grubunda kontrol grubuna kıyasla telomer uzunluğunun arttığı tespit edilmiş fakat fark anlamlı bulunmamıştır (Şekil 9).

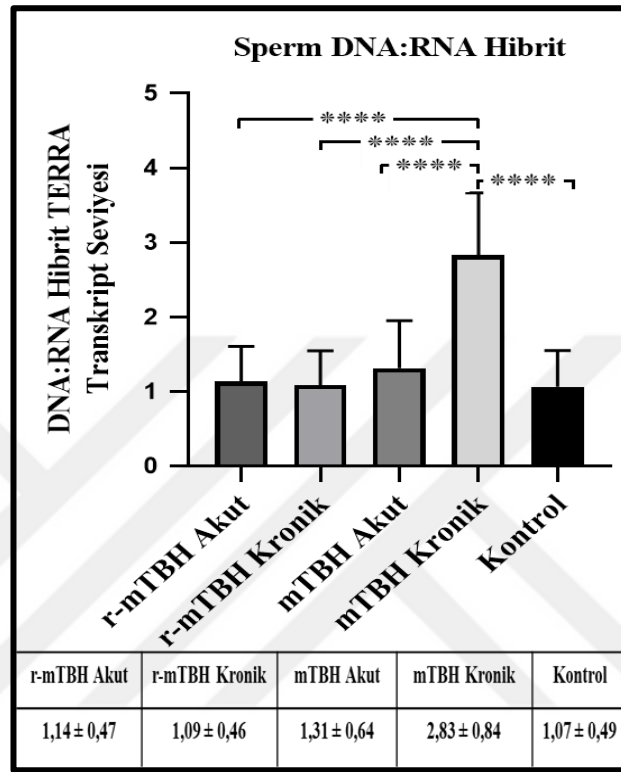
#### 4.3. mTBH ve r-mTBH'ndan Sonra Akut ve Kronik Gruplara Ait Sperm Hücrelerinden Elde Edilen Total RNA Örneklerinde Total TERRA Ekspresyon Seviyeleri



**Şekil 10.** mTBH ve r-mTBH'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait sperm hücrelerinden elde edilen RNA örneklerinde total TERRA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

r-mTBH akut, r-mTBH kronik, mTBH akut, mTBH kronik TBH grupları ve kontrol gruplarından elde edilen sperm örneklerinden izole edilen RNA örneklerinden belirlenen total TERRA seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında mTBH akut grubunda total TERRA ekspresyon seviyesinin r-mTBH akut ( $p \leq 0,05$ ), r-mTBH kronik ( $p \leq 0,01$ ), mTBH kronik ( $p \leq 0,05$ ) ve kontrol ( $p \leq 0,01$ ) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı arttığı tespit edilmiştir (Şekil 10).

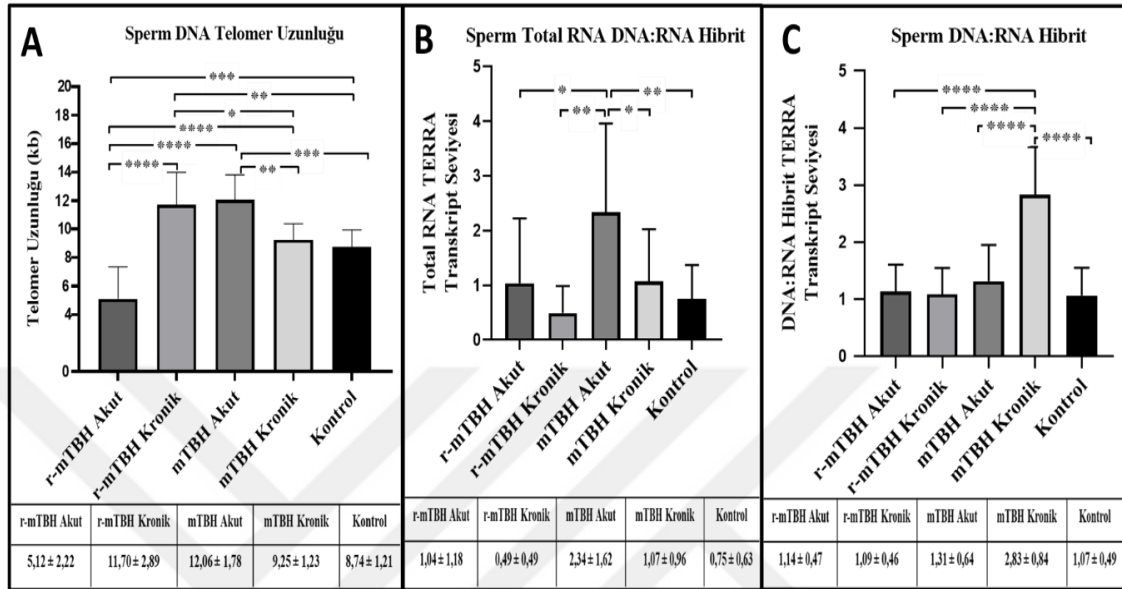
#### 4.4. mTBH ve r-mTBH'ndan Sonra Akut Ve Kronik Gruplarda Sperm Hücrelerinden İzole Edilen DNA:RNA Hibritlerinde Hibrit TERRA Ekspresyon Seviyeleri



**Şekil 11.** mTBI ve r-mTBI gruplarının sperm örneklerinden izole edilen Sperm hücrelerinde elde edilen DNA örneklerinden izole edilen DNA:RNA Hibrit örneklerinde hibrit TERRA ekspresyon seviyeleri (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ) .

mTBH ve r-mTBI'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait sperm örneklerinden izole edilen DNA:RNA hibrit örneklerinde hibrit TERRA ekspresyon seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında bütün gruplara göre mTBH kronik grubunda hibrit TERRA ekspresyon seviyesinin anlamlı arttığı tespit edilmiştir ( $p \leq 0,0001$ ) (Şekil 11).

#### 4.5. TBH'ndan Sonra Akut ve Kronik Dönemde Sperm Telomer Uzunluğu, Sperm DNA:RNA Hibritlerinde Hibrit TERRA ve Sperm Total RNA Örneklerinde Total TERRA Seviyelerinin Birlikte Gösterilmesi



**Şekil 12.** TBH'dan sonra akut ve kronik mTBI gruplarına ait sperm hücrelerinde telomer uzunluğu, B. TBH'dan sonra akut ve kronik mTBI gruplarına ait sperm hücrelerinde total TERRA ekspresyon seviyeleri, C. TBH'dan sonra akut ve kronik mTBI gruplarına ait sperm hücrelerinde DNA:RNA hibrit TERRA ekspresyon seviyeleri (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

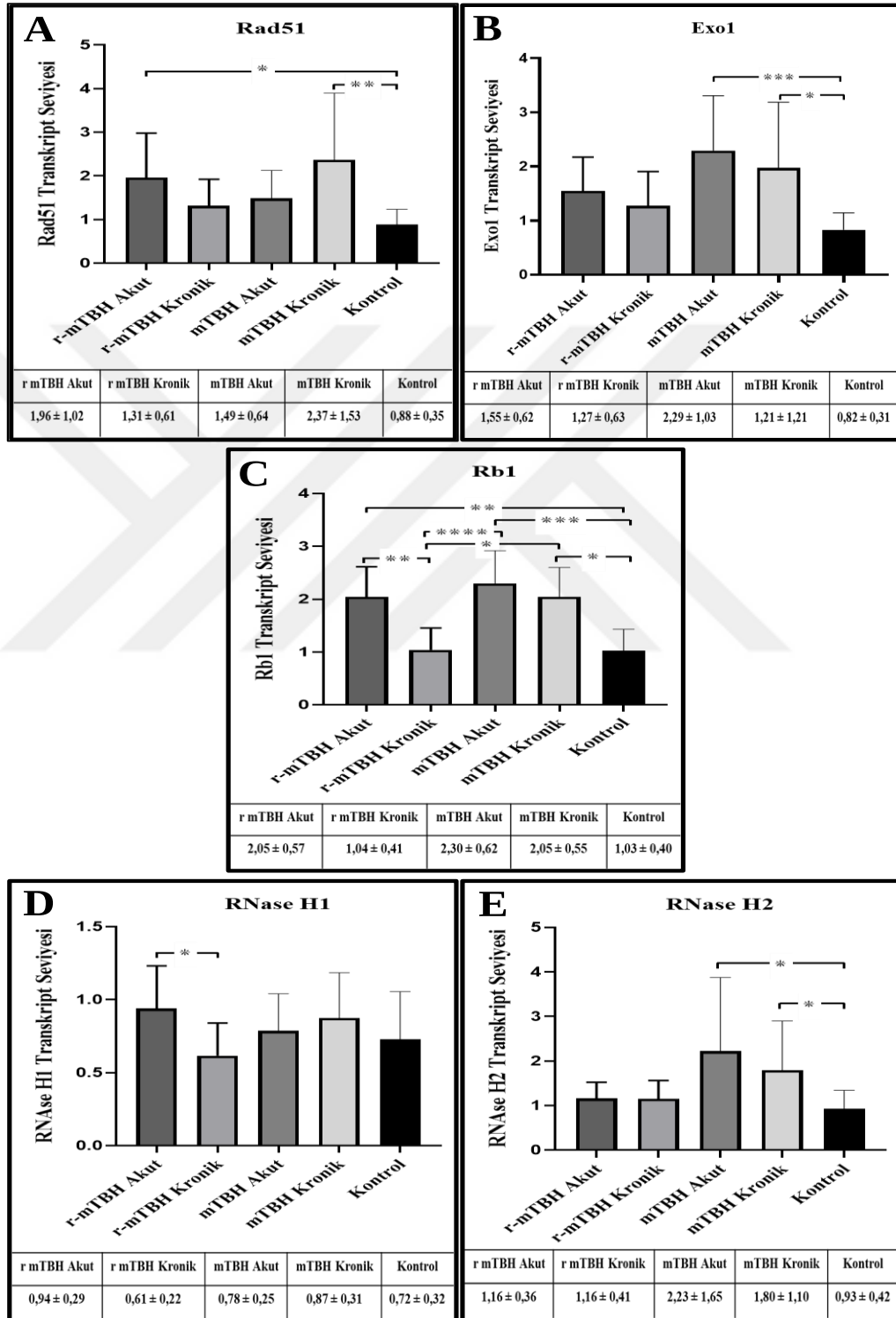
#### 4.6. Gruplar İçinde Total TERRA ve DNA:RNA Hibritleriyle Telomer Uzunluğu Arasında Korelasyon Analizi

**Tablo 7** Gruplar içinde Total TERRA ve DNA:RNA hibritleriyle telomer uzunluğu arasında korelasyon analizi

|               | Total TERRA & Telomer Uzunluğu |         | DNA: RNA Hibrit & Telomer Uzunluğu |         |
|---------------|--------------------------------|---------|------------------------------------|---------|
|               | rho                            | p-value | rho                                | p-value |
| r-mTBH-Akut   | -0,04                          | 0,908   | 0,036                              | 0,917   |
| r-mTBH-Kronik | 0,225                          | 0,56    | 0,023                              | 0,947   |
| mTBH-Akut     | 0,342                          | 0,334   | 0,267                              | 0,427   |
| mTBH-Kronik   | 0,133                          | 0,698   | -0,318                             | 0,341   |
| Kontrol       | 0,28                           | 0,404   | 0,151                              | 0,638   |

TBH'ndan sonra sperm örneklerinde gruplar arasında Total TERRA ve DNA:RNA hibritleri seviyeleri ile telomer uzunluğu arasında korelasyon analizi yapıldığında herhangi bir grupta anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

**4.7. mTBH ve r-mTBH'ndan Sonra Akut ve Kronik Gruplara Ait Sperm Hücrelerinden Telomer Uzunluğunun ve DNA Hasar Cevabının Regülasyonunda Görevli *Rad51*, *Exo1*, *Rb1*, *RNase H1* ve *RNase H2* Genlerin Transkript Seviyeleri**



**Şekil 13.** *Rad51*, *Exo1*, *Rb1*, *RNase H1* ve *RNase H2* genlerinin mRNA transkript seviyeleri.

**A.** mTBH ve r-mTBH'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait sperm örneklerinde *Rad51* geni transkript seviyeleri. **B.** mTBH ve r-mTBH'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait sperm örneklerinde *Exo1* geni transkript seviyeleri. **C.** mTBH ve r-mTBH'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait sperm örneklerinde *Rb1* geni transkript seviyeleri. **D.** mTBH ve r-mTBH'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait sperm örneklerinde *RNase H1* geni transkript seviyeleri. **E.** mTBH ve r-mTBH'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait sperm örneklerinde *RNase H2* geni transkript seviyeleri (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

mTBH ve r-mTBH'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait sperm örneklerinden izole edilen RNA örneklerinde *Rad51* geni transkript seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında; bütün gruplarda kontrol grubuna göre *Rad51* geninin transkript seviyesinin arttığı fakat bu artışın sadece mTBH kronik grubunda ( $p < 0,01$ ) ve r-mTBH akut grubunda ( $p < 0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 13A).

mTBH ve r-mTBH'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait sperm örneklerinden izole edilen RNA örneklerinde *Exo1* geni transkript seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında; bütün gruplarda kontrol grubuna göre *Exo1* geninin transkript seviyesinin arttığı fakat bu artışın sadece mTBH akut grubunda ( $p < 0,001$ ) ve mTBH kronik grubunda ( $p < 0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 13B).

mTBH ve r-mTBH'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait sperm örneklerinden izole edilen RNA örneklerinde *RNaseH1* geni transkript seviyelerinin: r-mTBH akut grubunun *Rb1* geni transkript seviyesinin kontrol grubuna göre arttığı ( $p < 0,01$ ), mTBH akut grubunun *Rb1* geni transkript seviyesinin kontrol grubuna göre arttığı ( $p < 0,001$ ) ve mTBH kronik grubunun *Rb1* geni transkript seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı arttığı ( $p < 0,05$ ) tespit edilmiştir. Ayrıca gruplar arasında kıyaslama yapıldığında; r-mTBH akut grubunun *Rb1* geni transkript seviyesinin r-mTBH kronik grubuna göre artış gösterdiği ( $p < 0,01$ ), mTBH akut grubunun *Rb1* geni transkript seviyesinin r-mTBH kronik grubuna göre artış gösterdiği ( $p < 0,0001$ ) ve mTBH kronik grubunun *Rb1* geni transkript seviyesinin r-mTBH kronik grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği ( $p < 0,05$ ) tespit edilmiştir (Şekil 13C).

mTBH ve r-mTBH'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait sperm örneklerinden izole edilen RNA örneklerinde *RNaseH1* geni transkript seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında; r-mTBH akut grubunun *RNaseH1* geni transkript seviyesinin r-mTBH akut grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği ( $p<0,05$ ) tespit edilmiştir (Şekil 13D).

mTBH ve r-mTBH'ndan sonra akut ve kronik gruplara ait sperm örneklerinden izole edilen RNA örneklerinde *RNaseH2* geni transkript seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında; mTBH akut grubunu ( $p<0,05$ ) ve mTBH kronik grubunu ( $p<0,05$ ) kontrol grubuna göre *RNaseH2* geni transkript seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı arttığı tespit edilmiştir (Şekil 13E).

#### 4.8. Total TERRA ve Genler Arasında Korelasyon Analizi

**Tablo 8** Total TERRA ve genler arasındaki korelasyon analizi sonuçları.

|               | Exo1   |         | Rad51  |         | Rb1    |         | RNase H1 |         | RNase H2 |         |
|---------------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|----------|---------|----------|---------|
|               | rho    | p-value | rho    | p-value | rho    | p-value | rho      | p-value | rho      | p-value |
| r-mTBH-Akut   | -0,089 | 0,794   | -0,042 | 0,896   | 0,175  | 0,568   | 0,222    | 0,512   | -0,045   | 0,884   |
| r-mTBH-Kronik | 0,037  | 0,903   | -0,584 | 0,036   | 0,394  | 0,163   | -0,325   | 0,33    | -0,296   | 0,326   |
| mTBH-Akut     | 0,706* | 0,015   | 0,402  | 0,154   | 0,024  | 0,935   | 0,079    | 0,828   | 0,531    | 0,114   |
| mTBH-Kronik   | -0,173 | 0,591   | 0,312  | 0,323   | -0,745 | 0,021   | 0,269    | 0,424   | 0,168    | 0,622   |
| Kontrol       | -0,295 | 0,441   | -0,268 | 0,426   | 0,22   | 0,492   | 0,591    | 0,094   | 0,31     | 0,354   |

TBH'ndan sonra sperm örneklerinde Total TERRA ve genler arasında korelasyon analizi sonuçlarına göre; sadece mTBH akut grupta *Exo1* transkript seviyeleri ve Total TERRA ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı pozitif yönlü korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.9. DNA:RNA Hibrit TERRA ve Genler Arasında Korelasyon Analizi

**Tablo 9** DNA:RNA Hibrit TERRA ve genler arasındaki korelasyon analizi sonuçları.

|               | Exo1   |         | Rad51  |         | Rb1    |         | RNase H1 |         | RNase H2 |         |
|---------------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|----------|---------|----------|---------|
|               | rho    | p-value | rho    | p-value | rho    | p-value | rho      | p-value | rho      | p-value |
| r-mTBH-Akut   | 0,115  | 0,722   | -0,049 | 0,88    | 0,573* | 0,041   | 0,744**  | 0,009   | 0,203    | 0,506   |
| r-mTBH-Kronik | -0,118 | 0,729   | 0,208  | 0,539   | 0,367  | 0,266   | -0,166   | 0,67    | 0,257    | 0,445   |
| mTBH-Akut     | 0,798* | 0,006   | 0,620* | 0,032   | 0,532  | 0,075   | -0,262   | 0,531   | 0,860**  | 0,001   |
| mTBH-Kronik   | 0,353  | 0,26    | 0,099  | 0,76    | -0,108 | 0,783   | 0,008    | 0,982   | 0,316    | 0,343   |
| Kontrol       | -0,45  | 0,916   | 0,062  | 0,814   | 0,462  | 0,178   | 0,835**  | 0,01    | 0,572    | 0,107   |

TBH'ndan sonra sperm örneklerinde DNA:RNA Hibrit TERRA ve genlerin transkript seviyeleri arasında korelasyon analizi sonuçlarına göre; r-mTHB akut grupta *Rb1* ve

*RNase H1*, mTBH akut grupta *Exo1*, *Rad51* ve *RNase H2*, kontrol grubunda *RNase H1* transkript seviyeleri ve DNA:RNA Hibrit TERRA ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı pozitif yönlü korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.10. Telomer Uzunluğu ve Genler Arasında Korelasyon Analizi

**Tablo 10** Telomer uzunluğu ve genler arasında korelasyon analizi sonuçları.

|               | Exo1   |         | Rad51  |         | Rb1    |         | RNase H1 |         | RNase H2 |         |
|---------------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|----------|---------|----------|---------|
|               | rho    | p-value | rho    | p-value | rho    | p-value | rho      | p-value | rho      | p-value |
| r-mTBH-Akut   | 0,413  | 0,236   | 0,481  | 0,159   | -0,143 | 0,659   | -0,461   | 0,18    | 0,248    | 0,437   |
| r-mTBH-Kronik | -0,019 | 0,958   | -0,54  | 0,107   | 0,541  | 0,086   | -0,342   | 0,408   | -0,13    | 0,721   |
| mTBH-Akut     | 0,814* | 0,014   | 0,502  | 0,116   | 0,178  | 0,6     | 0,266    | 0,565   | 0,294    | 0,442   |
| mTBH-Kronik   | -0,093 | 0,813   | -0,543 | 0,131   | 0,109  | 0,816   | -0,44    | 0,203   | 0,351    | 0,394   |
| Kontrol       | -0,065 | 0,878   | 0,041  | 0,91    | 0,116  | 0,734   | 0,792*   | 0,019   | -0,212   | 0,556   |

TBH'ndan sonra sperm örneklerinde telomer uzunluğu ve genlerin transkript seviyeleri arasında korelasyon analizi sonuçlarına göre; mTHB akut grupta *Exo1*, kontrol grubunda da *RNase H1* transkript seviyeleri ve telomer uzunluğu arasında anlamlı pozitif yönlü korelasyon olduğu tespit edilmemiştir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sperm hücresinin başlıca biyolojik işlevi, babaya ait genetik ve epigenetik bilgiyi embriyoya iletmektir. Giderek artan epidemiyolojik çalışmalar, babanın çevresel maruziyetler ve yaşam tarzının neden olduğu stresin, sperm epigenomunu, sperm-yumurta füzyonunu, embriyo gelişimini ve yavru sağlığını değiştirebildiğini göstermektedir. Memeli hücrelerinin birtakım çevresel streslere ya da farklı faktörlere maruz kalması sperm ve yumurta genomunun yeniden regülasyonuna epimutasyon adı verilir ve bu epimutasyonlar aynı genetik değişiklikler gibi nesiller arasında zincirleme reaksiyonlara yol açabilir (Johannes Bohacek ve Rassoulzadegan, 2020 ; Xu ve ark, 2021).

Çevresel faktörlerin sperm RNA komponentini yani epigenetik kalıtımı değiştirdiğini gösteren ilk veriler Katharina Gapp ve arkadaşlarının laboratuvarından gelmiştir (Gapp ve ark, 2014). Bu çalışmada erken yaştaki travmatik stresin, spermde birkaç miRNA ve piRNA kümesinde uzun süreli değişikliklere neden olduğunu ve çocukta stresle başa çıkma davranışlarında, metabolizmada ve stres kaynaklı glikoz salınımında karmaşık değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca izole ettikleri total sperm RNA'nın döllenmiş oositlerine enjeksiyonu sonucunda spermdeki bu değişikliklerin çocukta fenokopi etkisi yarattığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, Christopher Morgan'ın grubu, ergen ve yetişkinlerin kronik strese maruz kalmasının sperm RNA profilini değiştirdiğini ve belirlenen miRNA'lardan dokuzunun intra-zigotik enjeksiyonunun zigottaki birkaç hedef mRNA'nın ekspresyonunu azalttığı ve yetişkinlikte körelmiş Hipotalamus–Hipofiz–Adrenal (HPA) aksının aktivasyonunu indüklediğini göstermişlerdir (Morgan ve ark, 2020).

TBH, kafaya alınan darbe sonucunda oluşan kinetik enerjinin kafatası ve beyin dokularını ilgilendiren bir hasara dönüşmesidir. TBH şiddeti Glasgow Koma Skalası ile değerlendirilir ve hafif (mild), orta (moderate) ve şiddetli (severe) olarak sınıflandırılır. Mild TBH (mTBH) en sık görülen tipidir ve tanısı ve takibi oldukça zordur. Bununla birlikte de çoğu zaman gözden kaçmaktadır. Bugün aktif spor dalları ile uğraşan ergen ve adolesanlarda ve futbol, boks, kickboks gibi spor dalları ile uğraşan sporcularda mTBH sıklığı oldukça fazladır. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan istatistiklere göre, rekabetçi spor aktiviteleri kapsamında yılda 1,6–3,8 milyon kişi mTBH'na maruz kalmaktadır; ancak bunların yaklaşık yarısı bildirilmemekte ve bu sayı sporla ilgili tüm yaralanmaların % 5-9'unu oluşturmaktadır (Tayebi ve ark, 2021) ve bu sporcularda meydana gelen tekrarlı mTBH'nın kronik dönemde posttravmatik stres bozuklukları, demans, Alzheimer ve hipofiz yetmezliği gibi birçok hastalığa neden olduğu da literatürde gösterilmiştir (Keleştimur, 2005).

TBH organizma için oldukça stres oluşturan bir durumdur ve meydana geldiğinde HPA aksı aktive olur ve hipotalamustan CRH salgılanır. Salgılanan CRH ise hipofizden ACTH salınmasını, salınan ACTH'da adrenalenden kortizol salınmasına neden olur (Keleştimur, 2005). Kortizolün hücre yaşlanması üzerine olan negatif etkileri zaten bilinmektedir ve stres hormonu olan kortizol ve hücre yaşlanma arasındaki bağlantıyı gösteren birçok çalışma vardır. Ayrıca TBH'ndan sonra sekonder hasar ile birlikte ortaya çıkan kalıcı nöroinflamasyon da hücre yaşlanmanın ana tetikleyicilerindendir. Hücre yaşlanma, insan yaşlanmasında ve bazı insan hastalıklarının patobiyolojisinde; telomer fonksiyonu ve regülasyonu çok önemli bir role sahiptir (Balk ve ark, 2013; Juríková ve ark, 2021).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, germ hücreleri üzerinden baba yaşam öyküsünün, çocuğu metabolik ve nöropsikiyatrik hastalıklar dahil olmak üzere artan karmaşık bozukluk riskine yatkın hale getirdiği öne sürülmektedir. Özellikle son birkaç yılda invitro fertilizasyon ve germ hücre hattında, birtakım çevresel faktörlerin yavruların fenotipini etkileyebileceğini kanıtlamak için yapılan çalışmalarda sperm-RNA'larının, babadan edinilen bilgileri yavrulara taşıyan vektörler olduğu ortaya çıkmıştır. Yapılan bir çalışmada da sperm RNA'larının, yavruların gelişimini ve sağlığını doğrudan etkileyebileceği gösterilmiştir (Gapp ve Bohacek, 2018). Daha sonra yapılan

çalışmalarda da endokrin bozucular, kronik stres veya diyet gibi çeşitli çevresel faktörlerin sperm hücrelerindeki küçük kodlamayan RNA'ların bileşimini değiştirdiği gösterilmiştir (Bohacek ve Rassoulzadegan, 2020).

mTBH direk olarak darbenin kafaya alınmasına rağmen organizmayı sistemik olarak etkilediği bilinmektedir (Sabet ve ark, 2021). Bu nedenle de özellikle tekrarlayan mTBH gonadal sistemi ve gonas hücrelerinin genomunun regölasyonunu da etkileyebilir. Çevresel faktörlerin sperm RNA komponentini yani epigenetik kalıtımı değiştirdiği literatürde gösterilmiştir (Gapp ve ark, 2014).

Ayrıca, TBH, spermatogenez sürecini kontrol eden Hipotalamus–Hipofiz–Gonadal (HPG) aks disfonksiyonunun da ana nedenidir. TBH'na bağlı olarak işleyişi değişen HPG aksında spermatogenez ve oogeneز sürecini etkileyecektir fakat bu durumun gametlerin genomunu ne kadar etkilediği ve bu etkinin bir sonraki jenerasyona aktarılma potansiyeli olup olmadığı henüz bilinmektedir.

Literatürden elde ettiğimiz veriler doğrultusunda; bu çalışmadaki amacımız ergenlerin, adölesanların ve sporcuların sıklıkla maruz kaldığı tekrarlayan mTBH'nın sperm genomunun regölasyonunu değiştirip değiştirmediğini araştırmaktır. Eğer mTBH'ın sperm genomunun regölasyonu üzerine etkisi var ise bu durum bu etkinin sonraki nesillere de aktarılabilceği riskini de taşımaktadır.

Telomerler, kromozomların DNA ve protein içeren terminal (uç) bölgeleridir. Memeli hücrelerinin çoğunda, telomerler hücre bölünmesiyle beraber kısalır ve hücre hayflick sınırına eriştiğinde kısalma durarak hücresel yaşlanmayı takiben büyümenin duraklatılmasıyla sonuçlanır fakat bu mekanizma henüz yaşlanma için bir yaklaşımdır, literatürde yapılan çalışmalar telomerlerin telomeraz enziminden bağımsız olarak regüle edilebildiğini göstermektedir (Juríková ve ark, 2021; Lipps ve Rhodes, 2009). Spesifik olarak, erkekler yaşlandıkça sperm hücrelerinin telomer uzunlukları da giderek artmaktadır, fakat oositlerin telomer uzunluğundaki değişimler sperminkiyle benzer profile sahip değildir. Bununla birlikte, bölünme aşamaları sırasında embriyoların telomer uzunluğunun babadan geğtiği bildirilmektedir fakat embriyo oluştuktan sonra telomer uzunluğu, blastosist aşaması sırasında telomeraz aktivitesi ile uzatılabilir (Anifandis ve ark, 2021).

Uzun yıllar boyunca telomerlerin transkripsiyonel olarak sessiz olduğu yani bu bölgelerden RNA transkripsiyonu yapılmadığı düşünülmüştür; ancak 2007'de, bazı kromozom uçlarında bulunan subtelomer bölgelerinden Telomeric Repeat Containing RNA (TERRA)' adı verilen uzun kodlanmayan RNA'ların (lncRNAs) transkribe olduğu bildirilmiştir. TERRA'ların hem kromozom uçlarını degradasyondan koruduklarını hem de genom stabilizasyonunu sağladıkları literatürde gösterilmiştir (Azzalin ve ark, 2007).

Literatürde ebeveynlerin maruz kaldıkları çevresel etkenlerin sperm ve yumurta genomu üzerinden yavrulara aktarıldığı ile ilgili olarak az sayıda çalışma mevcuttur bu nedenle de bugün nedeni bilinmeyen birçok hastalığın mekanizmasının çözülmesine de yönelik olarak farklı çevresel etkenlerin gametlerin genomunu nasıl etkilediğinin ve bir sonraki nesile nasıl etkileri olabileceği konusunda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu nedenle özellikle ergenlerin, adolesanların ve sporcuların sıklıkla maruz kaldığı TBH'nın sperm genomunun telomer fonksiyonu ve regülasyonu üzerine etkisi olup olmadığını araştırmak amacıyla; bu çalışmada mTBH ve tekrarlı mTBH (r-mTBH) fare modeli oluşturulmuş ve akut ve kronik fazlarda sperm hücrelerinde telomer uzunluğu değişimleri, telomer uzunluğunun ve genom stabilizasyonunun korunmasında görevli total ve hibrit TERRA ekspresyon seviyeleri ile birlikte TERRA'nın ve DNA hasar cevabının regülasyonunda görevli *Rad51*, *Exo1*, *Rb1*, *RNase H1* ve *RNase H2* genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler araştırılmıştır.

Planlanan çalışmada öncelikle TBH'nın sperm hücrelerinde major bir DNA hasarı oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacıyla mTBH ve tekrarlı mTBH oluşturulduktan sonra akut ve kronik fazlarda farelerin sperm hücrelerinde major bir DNA hasarı olup olmadığını belirlemek amacıyla Hoechst ve Akridin Oranj boyama yapılmıştır. Akridin Oranj boyama, sperm hücrelerinde DNA iplik kırıklarının tespiti için, Hoechst boyama ise hücrelerde morfolojik olarak apoptotik değişim olup olmadığını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Yapılan Akridin Oranj ve Hoechst boyanma sonucunda TBH'nın sperm hücrelerinde apoptosise ve DNA kırığına sebep olmadığı tespit edilmiştir. TBH'nın DNA'da majör bir hatadan daha çok minör değişikliklere neden olarak genomun regülasyonunu değiştirdiğini düşünmekteyiz.

Bu nedenle öncelikle tekrarlı mTBH'nın telomer uzunluğu üzerine etkisi olup olmadığını araştırmak amacıyla r-mTBH akut, r-mTBH kronik, mTBH akut, mTBH kronik TBH grupları ve kontrol grubu oluşturulduktan sonra farelerden alınan sperm örneklerinden elde edilen DNA örneklerinde telomer uzunlukları belirlenmiştir ve sperm hücrelerinde mTBH akut ve r-mTBH kronik grubunda telomer uzunluklarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. İlginç birşekilde mTBH akut grubunda telomer uzunluğu TBH'ndan sonra artarken mTBH kronik grubunda tekrar kısalarak kontrol grubu ile aynı düzeye geldiği fakat tekrarlı TBH kronik grubunda tekrar telomer uzunluğunun arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca sperm telomer uzunluğunun en fazla tekrarlı mTBH akut grubunda kısaldığı tespit edilmiştir. Bilindiği gibi yaşlı kişilerin sperm hücrelerindeki telomerlerin gençlere göre daha uzun olduğu gösterilmiştir (Aguado ve ark, 2020). Yani sperm hücrelerinde telomer uzunluğunun artması yaşlanma ile ilişkilidir fakat bu durumun sonraki nesiller üzerine olan etkisi ve zigot oluştuktan sonra regülasyonunun nasıl yapıldığı henüz bilinmemektedir.

Literatürde TBH'nın sperm hücrelerindeki telomerler üzerine etkisi olup olmadığını araştıran Harleen Hehar ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları sadece bir çalışma vardır. Bu çalışmada sadece TBH'nın etkisi araştırılmamış, TBH ile birlikte yüksek yağlı diyetin ve baba yaşının etkisini araştırmışlardır ve babanın yaşının ve beslenme biçiminin yavru fenotipini etkilediğini, aynı zamanda, belirli genlerin DNA metilasyonunu değiştirerek TBH sonrası bireysel farklılıklara aracılık ettiğini göstermişlerdir. Sperm telomer uzunluğu açısından gruplar arasında fark tespit edemeseler de tek sefer uygulanan TBH'nın spermde, *Beyinden türetilen nörotrofik faktör (Bdnf)*, *Leptin reseptör (Lept-R)*, *Oksitosin reseptör (Oxy-R)*, *Telomeraz reverse transkriptaz (Tert)*, *İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 (Igf2)* ve *İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 reseptörü (Igf2-R)* genlerinin promotor metilasyon profilini değiştirdiğini tespit etmişlerdir. Telomer uzunluğu açısından Harleen Hehar ve arkadaşlarının elde ettiği verileri ile bizim çalışmamızın sonuçları uyumlu olmasa da Harleen Hehar ve arkadaşlarının tespit ettiği TBH'nın DNA metilasyon profilindeki değişikliklere neden olduğu ile ilgili veri, TBH'nın sperm genom regülasyonunu değiştirebileceği konusundaki hipotezimizin doğruluğunu işaret etmektedir (Hehar ve ark, 2017).

Bilindiği gibi subtelomer bölgelerinden transkribe olan uzun kodlanmayan RNA olan TERRA telomer regülasyonunda, DNA hasar cevabında ve genom stabilizasyonunun korunmasında önemli rol oynamaktadır. TERRA transkriptleri subtelomer bölgelerinden

transkribe olduktan sonra telomerlere yeniden hibridize olarak, telomeraz aktivitesini, telomer uzunluğunu ve ilişkili heterokromatinizasyonu düzenleyerek genomun stabilitesini sağlamaktadır. Bu nedenle TERRA ekspresyon seviyesini belirlerken hem total ekspresyonu hem de DNA'ya bağlanarak fonksiyonel olan Hibrit TERRA seviyesini belirlemek gerekmektedir. TERRA'nın ekspresyon seviyesindeki artma ve azalmalar, değişen telomer uzunluğu, genomik instabilite, kontrolsüz hücre bölünmesi ve hücresel yaşlanma ile ilişkilidir. Ortaya çıkan kanıtlar normal durumda TERRA transkriptlerinin kromozom uçlarında telomerler arasında homolog rekombinasyonu teşvik ettiği, hücresel yaşlanmayı geciktirdiği ve genom stabilizasyonunun korunması için DNA:RNA hibritleri oluşturduğunu göstermektedir (Wang ve ark, 2015).

Bu çalışmada akut ve tekrarlı TBH'ndan sonra akut ve kronik fazda farelerden elde edilen total RNA örneklerinden TBH'na cevapta öncelikle transkribe olan TERRA seviyelerindeki değişimler araştırılmıştır. mTBH akut grubuna ait farelerin spermalarında Total TERRA transkript seviyesinin diğer TBH gruplarına ve kontrol grubuna göre anlamlı arttığı tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre TBH'ndan sonra verilen ilk cevapta TERRA transkriptleri rol oynamaktadır. Bununla birlikte mTBH ve tekrarlı mTBH'ndan sonra akut ve kronik fazlarda telomer ve genom stabilizasyonunu korumak için DNA üzerine hibridize olan hibrit TERRA transkript seviyeleri de belirlenmiştir. Hibrit TERRA transkript seviyesinin de en fazla mTBH kronik grubunun sperm örneklerinde anlamlı arttığı tespit edilmiştir. Bu konuda literatürde oldukça az sayıda çalışma olmasına rağmen yapılan çalışmalarda telomerlerin, telomeraz tarafından uzatıldığı ve belirli streslerin yanı sıra bir subtelomer transkripti olan TERRA tarafından kısaltıldığı ayrıca genellikle somatik hücrelerde telomer uzunluğu ve TERRA seviyelerinin ters korele olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, TERRA'nın nesiller arası etkilerin altında yatan mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Liu ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada TERRA, sperm yoluyla zigotlara nesiller boyu aktarıldığını ve telomer kısalmasına neden olduğunu tespit etmişler ve TERRA'nın, yavrularda baba stresinin neden olduğu telomer kısalmasında kilit rol oynadığını öne sürmüşlerdir (Liu ve ark, 2019). Yaptığımız çalışmada mTBH akut grubuna ait sperm örneklerinde total ve mTBH kronik grubuna ait sperm örneklerinde hibrit TERRA seviyelerinin arttığı bulunmuştur ve hipotezimizle tutarlı olarak literatürde TERRA seviyesindeki değişikliklerin bir sonraki nesile aktarıldığı ve telomer uzunluğuna da etkisi olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark, 2019).

Bu çalışmada mTBH ve tekrarlı mTBH'ndan sonra akut ve kronik fazlarda farelerden elde edilen sperm örneklerinde ayrıca DNA hasar cevabında ve telomer regülasyonunda görevli *Rad51*, *Exo1*, *Rb1*, *RNase H1* ve *RNase H2* genlerinin transkript seviyeleri de belirlenmiştir.

TERRA'nın tam fonksiyonel olması için telomer uçlarına hibridize olması gerekmektedir. TERRA'ların telomer bölgesinde toplanma ve R-döngülerinin oluşumu süreci Rad51 (Rad51 recombinase) proteinine ve 5'-UUAGGG-3' tekrarlarına bağlıdır. Yaptığımız çalışmada *Rad51* geni transkript seviyesinin hibrit TERRA seviyeleri ile korele olarak mTBH kronik grubunun sperm hücrelerinde arttığı tespit edilmiştir. Feretzaki ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları çalışmada Rad51'in TERRA'nın R-loop formasyonuna doğrudan iştirak ettiği, Rad51'in TERRA'ya güçlü bir şekilde bağlandığı ve TERRA'nın in vitro ortamda telomerik dizilere bağlanmasını katalize ettiğini, yani Rad51 TERRA'nın DNA:RNA hibrit formasyonu için elzem olduğunu göstermiştir (Feretzaki ve ark, 2020). Yaptığımız çalışma sonucunda literatür ile uyumlu olarak TERRA transkriptlerinin telomer bölgesine hibridize olması için gerekliliği bildirilen Rad51'in mTBH kronik TBH grubunda Hibrit TERRA ile korele olarak artmıştır.

Telomer tandem tekrarındaki (TTAGGG) üçlü guanin akışı nedeniyle, telomerik DNA bu yapıları oluşturma konusunda yüksek bir eğilime sahiptir ve G-quadrupleksler replikasyon makinesine açık bir şekilde engel teşkil etmektedir. Bu nedenle bu bölgelerin uygun şekilde açılması ve çoğaltılması telomer bütünlüğü ve genomik stabilitenin sağlanması için çok büyük önem arz etmektedir. Kendilerine özgü replikasyon güçlüklerinin üstesinden gelmek için telomerler, replikasyon çatalında oluşan ikincil yapıları çözmek ve doğru replikasyonunu sağlamak için birçok helikaz ve nükleaz birlikte kompleks oluşturarak görev yapar. *Exo1* geni 5' -3' eksonükleaz ve RNase H aktivitesine sahip bir proteini kodlar ve telomeraz aktivitesinin azaldığı hücrelerde RNA hibritlerinin zamanında uzaklaştırılmasını sağlayarak telomerlerin korunmasında önemli rol oynamaktadır. Zamanında telomer ve genler arasına bağlanan hibritlerin uzaklaştırılamaması durumunda hücre replikasyon stresine girecektir (Stroik ve ark, 2020). Yaptığımız çalışma sonucunda *Exo1* geni transkript seviyesinin kontrol grubuna göre bütün TBH gruplarında arttığı fakat bu artışın sadece mTBH akut ve mTBH kronik grubuna ait farelerin sperm örneklerinde anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

*Exo1* transkript seviyesinin artması spermde azalan telomeraz aktivitesi ile ilişkili olabilir.

Tümör baskılayıcı gen *Rb1*'in (Retinoblastoma transcriptional corepressor 1) osteoblastik hücrelerde telomer bütünlüğünün korunması için gerekli olduğu ve *Rb1*'in heterozigot mutasyonu, fare osteoblastlarında telomer instabilitesini tetikleyerek genomik kararsızlığa yol açtığı gösterilmiştir. Genel olarak, *Rb1*'in telomerlerin kondansasyon sürecini hem genetik hem de epigenetik olarak düzenlediği bildirilmiştir. Gonzalez ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada *Rb1*'in, TERRA transkript seviyelerinin modülasyonunu doğrudan düzenlenmesi yoluyla telomerik bütünlüğü etkilediği ve sonuçta telomer mimarisinin yapılandırılmasıyla sonuçlandığını göstermiştir (Gonzalez-Vasconcellos ve ark, 2017).

Elde ettiğimiz bulgulara göre; mTBH akut grubunda kontrol grubuna kıyasla *Rb1* transkript seviyesinde r-mTBH Akut, mTBH akut ve kronik TBH gruplarına ait sperm örneklerinde tekrarlı mTBH kronik ve kontrol grubuna göre oldukça anlamlı arttığı tespit edilmiştir. Literatüre göre elde *Rb1* transkript seviyesi ile ilgili elde ettiğimiz veriler TBH sonucunda bozulan genom bütünlüğünün korunmasını sağlamak için cevap olarak *Rb1* transkript seviyesinin artmasına neden olduğu için olabilir.

Ribonükleaz H (RNase H) DNA:RNA hibritlerinden RNA'yı spesifik olarak indirgeyen bir enzimdir. DNA:RNA hibritleri DNA'da çift iplik kırıklarına karşı (DSB) tekrarlayan DNA bölgelerini korumak için gereklidir. DNA:RNA hibritlerinin RNase H enzimleri tarafından kaldırılması, genomik stabilitenin korunması için önemlidir. 1969'daki keşfinden bu yana, enzim, katalitik mekanizması ve fizyolojik rolü için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. RNase H, Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere iki ana ailede sınıflandırılmıştır. Tip 1 enzimler, prokaryotlarda RNase HI ve ökaryotlarda RNase H1 olarak adlandırılırken, Tip 2 enzimler, prokaryotlarda RNase HII ve ökaryotlarda RNase H2 olarak adlandırılır. RNase H2, hem R-loop işleme hem de ribonükleotit eksizyon onarımı için G2/M'de temel bir işleve sahip olması bakımından sıkı hücre döngüsü düzenleme gereksinimlerine sahiptir. Bununla birlikte RNase H1, R-döngülerini çıkarmak için hücre döngüsünden bağımsız olarak işlev görebilir ve yüksek R-döngü yüklerine yanıt olarak aktif hale gelebilmektedir (Lockhart ve ark, 2019). Son çalışmalar, RNase H2'nin, genomik DNA'ya gömülü tek bir ribonükleotidin eksizyonunda ve hücrelerde oluşan bir R halkasının çıkarılmasında rol oynadığını göstermiştir (Kojima ve ark, 2018). R döngüleri, transkripsiyon ve DNA replikasyonunu

bloke edebildiklerinden, replikatif strese ve çift iplik kırıklarının oluşumuna neden olduklarından genom bütünlüğü için oldukça zararlıdır. RNase H2, çift iplik kırıklarının onarımı ve R-ilmeklerinin çıkarılması dahil olmak üzere çeşitli hücrel olaylarda önemli bir rol oynar (Kojima ve ark, 2018). Bu ilmekler RNase H kusurlu olduğu için çıkarılamadığında replikasyon çatalının ilerlemesini engelleyerek, tek ve çift zincirli DNA kırılmalarını indükleyebilir. Memeli embriyoları, RNase H1 veya RNase H2 yokluğunda yaşamdan doğuma ilerleyemez; her iki enzim de embriyogenez sırasında gereklidir (Cerritelli ve Crouch, 2019) .

Elde ettiğimiz veriler; mTBH akut grubunda RNase H1 transkript seviyesinin, mTBH akut ve mTBH kronik gruplarına ait sperm hücrelerinde de RNase H2 transkript seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı arttığını göstermektedir. Literatüre göre RNase H1 ve RNase H2 yokluğunda canlılığını sürdüremeyeceğini ve çift iplik kırıklarının ve R-ilmeklerinin çıkarılması için elzem olduğunu göstermektedir ve RNase H1 ve RNase H2 transkript seviyesindeki artmanın TBH sonucunda artan DNA hasarına ve kaldırılmadığı durumda replikasyon stresinin artmasına neden olan R-ilmeklerinin kaldırılmasında ortaya çıkan regülasyon bozukluğunu düzeltebilmek için transkript seviyeleri artıyor olabilir.

TBH organizma için oldukça stres oluşturan bir durumdur ve HPA aksının aktivasyonu ile birlikte kortizol seviyesi, sekonder hasar nedeniyle de nöroinflamatuvar cevap artmaktadır. Bilindiği gibi artan stres şartları ile birlikte yaşlanma süreci daha fazla tetiklenmektedir. Yaptığımız çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler TBH'nın sperm genomu üzerine etkisi olduğunu tek sefer mTBH uygulamasının ardından akut ve kronik fazdaki transkript seviyesindeki değişikliklerin tekrarlayan TBI ile birlikte akut fazda telomer uzunluğunda keskin bir azalma gösterdiği ve sonrasında da kronik fazda yaşlanma ile ilişkili olan sperm telomer uzunluğunun artmasına neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca literatürden elde edilen verilere göre TBH'nın spermde total TERRA ve DNA:RNA hibrit TERRA transkript seviyelerinde değişikliğe neden olması sperm genomunda telomer fonksiyonunun ve genom stabilizasyonunun bozulduğunun göstergesidir. Fakat TBH'nın embriyoya iletilen epigenetik hafızayı ne kadar değiştirdiği, spermde artan telomer uzunluğunun sonraki jenerasyon üzerine nasıl bir etkisi olabileceği konusu henüz bilinmemektedir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler TBH'na tekrarlı şekilde maruz kalan başta futbol, boks gibi spor dalları ile uğraşan kişiler TBH'nın olası etkisini paternal olarak yavrulara aktarma riskine sahiptirler. Bununla birlikte maternal etki de henüz bilinmemektedir. Bu nedenle de TBH'nın sonraki nesiller üzerine etkisi olup olmadığı fare modeli üzerinden jenerasyon takipleri yapılarak hem paternal hem de maternal olarak araştırılması gerekmektedir. Jenerasyonlar üzerine TBH'nın olası etkilerinin araştırılması sonucunda elde edilecek veriler TBH'nın etyolojisinin, TBH'ndan ortaya çıkan birtakım hastalıkların ve bugün nedeni bilinmeyen hastalıkların mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.



## 6. KAYNAKLAR

- Aguado J, d'Adda di Fagagna F, Wolvetang E. Telomere transcription in ageing. *Ageing Res. Rev.* 2020; 62: 101115.
- Anifandis G, Samara M, Simopoulou M, Messini CI, Chatzimeletiou,K, Thodou E, Daponte A, Georgiou I. Insights into the Role of Telomeres in Human Embryological Parameters . *Opinions Regarding IVF.* 2021.
- Arai JA, Li S, Hartley DM, Feig LA. Transgenerational rescue of a genetic defect in long-term potentiation and memory formation by juvenile enrichment. *J. Neurosci.* 2009; 29(5): 1496–1502.
- Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat. Rev. Genet.* 2012; 13(10): 693–704.
- Ashman TA, Gordon WA, Cantor JB, Hibbard MR. Neurobehavioral consequences of traumatic brain injury. *Mt. Sinai J. Med.* 2006; 73(7): 999–1005.
- Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriauli L, Giulotto E, Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 2007; 318(5851): 798–801.
- Balhorn R. Sperm Chromatin: An Overview. In *Sperm Chromatin* (pp. 3–18). Springer New York.
- Balk B, Maicher A, Dees M, Klermund J, Luke-Glaser S, Bender K, Luke B. Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013.
- Belanger HG, Spiegel E, Vanderploeg RD. Neuropsychological performance following a history of multiple self-reported concussions: A meta-analysis. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2010; 16(2): 262–267.
- Benito E, Kerimoglu C, Ramachandran B, Pena-Centeno T, Jain G, Stilling RM, Islam MR, Capece V, Zhou Q, Edbauer D, Dean C, Fischer A. RNA-Dependent Intergenerational Inheritance of Enhanced Synaptic Plasticity after

- Environmental Enrichment. *Cell Rep.* 2018; 23(2): 546–554.
- Bijur PE, Haslum M, Golding J. Cognitive outcomes of multiple mild head injuries in children. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 1996; 17(3): 143–148.
- Blackburn EH. Telomeres: No end in sight. *Cell* 1994; 77(5): 621–623.
- Blackburn E H. Telomeres and telomerase: The means to the end (Nobel lecture). *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2010; 49(41): 7405–7421.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279(5349): 349–352.
- Bohacek J, Farinelli M, Mirante O, Steiner G, Gapp K, Coiret G, Ebeling M, Durán-Pacheco G, Iniguez AL, Manuella F, Moreau JL, Mansuy IM. Pathological brain plasticity and cognition in the offspring of males subjected to postnatal traumatic stress. *Mol. Psychiatry* 2015; 20(5): 621–631.
- Bohacek J, Weber-Stadlbauer U, Mansuy IM. Paternal experience impacts cognitive function in offspring: A pre-existing concept. In *Molecular Psychiatry Nature* 2018; 23(4):794-795.
- Bohacek J, Rassoulzadegan M. Sperm RNA: Quo vadis? *Semin. Cell Dev. Biol.* 2020; 97: 123–130.
- Carrasco GA, Van De Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharmacol.* 2003; 463(1–3): 235–272.
- Casas E, Vavouri T. Sperm epigenomics: Challenges and opportunities. *Front. Genet.* 2014; 5.
- Cerritelli SM, Crouch RJ. RNases H: Multiple roles in maintaining genome integrity. In *DNA Repair*. Elsevier B.V. 2019;84:102742.
- Chen Q, Yan M, Cao Z, Li X, Zhang Y, Shi J, Feng GH, Peng H, Zhang X, Zhang Y, Qian J, Duan E, Zhai Q, Zhou Q. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science* (80-. ). 2016; 351(6271): 397–400.
- Chrousos GP, , Gold PW. The Concepts of Stress and Stress System Disorders: Overview of Physical and Behavioral Homeostasis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 1992; 267(9): 1244–1252.
- Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung YC, Punchak M, Agrawal A, Adeleye AO, Shrima MG, Rubiano AM, Rosenfeld JV, Park KB. Estimating the

- global incidence of traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* 2018; 130(4): 1080–1097.
- Dickson DA, Paulus JK, Mensah V, Lem J, Saavedra-Rodriguez L, Gentry A, Pagidas K, Feig LA. Reduced levels of miRNAs 449 and 34 in sperm of mice and men exposed to early life stress. *Transl. Psychiatry* 2018; 8(1): 101.
- Diman A, Decottignies A. Genomic origin and nuclear localization of TERRA telomeric repeat-containing RNA: from Darkness to Dawn. *FEBS J.* 2018; 285(8): 1389–1398.
- Fakharian E, Mohammadzadeh M, Behdadmehr S, Sabri HR, Mirzadeh AS, Mohammadzadeh J. Repetitive traumatic brain injury in patients from kashan, Iran. *Trauma Mon.* 2016; 21(4): 23869.
- Feretzaki M, Pospisilova M, Valador Fernandes R, Lunardi T, Krejci L, Lingner J. RAD51-dependent recruitment of TERRA lncRNA to telomeres through R-loops. *Nature* 2020; 587(7833): 303–308.
- Foote RH, Tardif AL, Farrell PB, Trouern-Trend V, Simkin ME, Foote RH. (n.d.). Use of Hoechst 33342 Stain to Evaluate Live Fresh and Frozen Bull Sperm by Computer-Assisted Analysis. In *Journal of Andrology* (Vol. 19, Issue 2).
- Gaetz M, Goodman D, Weinberg H. Electrophysiological evidence for the cumulative effects of concussion. *Brain Inj.* 2000; 14(12): 1077–1088.
- Gapp K, Bohacek J. Epigenetic germline inheritance in mammals: looking to the past to understand the future. In *Genes, Brain and Behavior*. Blackwell Publishing Ltd. 2018; 17(3):e12407.
- Gapp K, Bohacek J, Grossmann J, Brunner AM, Manuella F, Nanni P, Mansuy IM. Potential of Environmental Enrichment to Prevent Transgenerational Effects of Paternal Trauma. *Neuropsychopharmacol.* 2016 4111 2016; 41(11): 2749–2758.
- Gapp K, Jawaaid A, Sarkies P, Bohacek J, Pelczar P, Prados J, Farinelli L, Miska E, Mansuy IM. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat. Neurosci.* 2014; 17(5): 667–669.
- Geddes JF, Vowles GH, Nicoll JAR, Révész T. Neuronal cytoskeletal changes are an early consequence of repetitive head injury. *Acta Neuropathol.* 1999; 98(2): 171–178.
- Gonzalez-Vasconcellos I, Schneider R, Anastasov N, Alonso-Rodriguez S, Sanli-Bonazzi B, Fernández JL, Atkinson MJ. The Rb1 tumour suppressor gene

- modifies telomeric chromatin architecture by regulating TERRA expression. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 1–9.
- Graf M, Bonetti D, Lockhart A, Serhal K, Kellner V, Maicher A, Jolivet P, Teixeira MT , Luke B. Telomere Length Determines TERRA and R-Loop Regulation through the Cell Cycle. *Cell* 2017; 170(1):72-85.
- Grandjean V, Fourré S, De Abreu DAF, Derieppe MA, Remy JJ , Rassoulzadegan, M. RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders. *Sci. Rep.* 2015; 5: 1–9.
- Greider CW , Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* 1985; 43(2 PART 1): 405–413.
- Guskiewicz KM, Marshall SW, Bailes J, McCrea M, Cantu RC, Randolph C , Jordan BD. Association between recurrent concussion and late-life cognitive impairment in retired professional football players. *Neurosurgery* 2005; 57(4).
- Guskiewicz KM, Marshall SW, Bailes J, McCrea M, Cantu RC, Randolph C , Jordan BD. Association between Recurrent Concussion and Late-Life Cognitive Impairment in Retired Professional Football Players. *Neurosurgery* 2005; 57(4): 719–726.
- Halstead ME, Walter KD, Moffatt K. Sport-related concussion in children and adolescents. *Pediatrics* 2018; 142(6).
- Harley CB, Futcher AB , Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345(6274): 458–460.
- Hayflick L , Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1961; 25(3): 585–621.
- Hehar H, Ma I , Mychasiuk R. Intergenerational Transmission of Paternal Epigenetic Marks: Mechanisms Influencing Susceptibility to Post-Concussion Symptomology in a Rodent Model. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 1–14.
- Inano S, Sato K, Katsuki Y, Kobayashi W, Tanaka H, Nakajima K, Nakada S, Miyoshi H, Knies K, Takaori-Kondo A, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H , Takata M. RFW3-Mediated Ubiquitination Promotes Timely Removal of Both RPA and RAD51 from DNA Damage Sites to Facilitate Homologous Recombination. *Mol. Cell* 2017; 66(5): 622-634.e8.
- James SL, Bannick MS, Montjoy-Venning WC, Lucchesi LR, Dandona L, Dandona R, Hawley C, Hay SI, Jakovljevic M, Khalil I, Krohn KJ, Mokdad AH, Naghavi M,

- Nichols E, Reiner RC, Smith M, Feigin VL, Vos T, Murray CJL, Zaman SB. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019; 18(1): 56–87.
- Jeyapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, Herbig U. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech. Ageing Dev.* 2007; 128(1): 36–44.
- Juríková K, De WP, Cusanelli E. Nuclear Periphery and Telomere Maintenance: TERRA Joins the Stage. *Trends Genet.* 2021; 37(7): 608–611.
- Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, Kazerooni M, Ghanadi A, Ghaffarpasand F, Kazerooni Y, Zolghadr J. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26(11-12): 591-6.
- Keijzers G, Bakula D, Petr MA, Madsen NGK, Teklu A, Mkrtchyan G, Osborne B, Scheibye KM. Human Exonuclease 1 (EXO1) Regulatory Functions in DNA Replication with Putative Roles in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, Vol. 20, Page 74 2018; 20(1): 74.
- Keleştimur F. Chronic trauma in sports as a cause of hypopituitarism. *Pituitary* 2005; 8(3–4): 259–262.
- Kianmehr L, Khazali H, Rajabi-Maham H, Sharifi-Zarchi A, Cuzin F, Rassoulzadega M. Genome-Wide Distribution of Nascent Transcripts in Sperm DNA, Products of a Late Wave of General Transcription. *Cells* 2019; 8(10).
- Kim YJ, Sah RLY, Doong JYH, Grodzinsky AJ. Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258. *Anal. Biochem.* 1988; 174(1): 168–176.
- Kojima K, Baba M, Tsukiashi M, Nishimura T, Yasukawa K. RNA/DNA structures recognized by RNase H2. *Brief. Funct. Genomics* 2018; 18(3): 169–173.
- Lipps HJ, Rhodes D. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends Cell Biol.* 2009; 19(8): 414-22.
- Liu B, Maekawa T, Yoshida K, Ly NH, Inoue K, Hasegawa A, Chatton B, Ogura A, Ishii S. Telomere shortening by transgenerational transmission of TNF- $\alpha$ -induced TERRA via ATF7. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(1): 283–298.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001; 25(4): 402–408.
- Lockhart A, Pires VB, Bento F, Kellner V, Luke-Glaser S, Yakoub G, Ulrich HD, Luke

- B. RNase H1 and H2 Are Differentially Regulated to Process RNA-DNA Hybrids. *Cell Rep.* 2019; 29(9): 2890-2900.e5.
- Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z , Wan M. Telomeres - Structure, Function, and Regulation. *Exp. Cell Res.* 2013; 319(2): 133.
- Lupien S, Lecours AR, Lussier I, Schwartz G, Nair NPV , Meaney MJ. Basal cortisol levels and cognitive deficits in human aging. *J. Neurosci.* 1994; 14(5 I): 2893–2903.
- Marmarou A, Abd-Elfattah FMA, Van den Brink W, Campbell J, Kita H , Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J. Neurosurg.* 1994; 80(2): 291–300.
- Masel BE , DeWitt DS. Traumatic brain injury: A disease process, not an event. *J Neurotrauma* 2010; 27(8): 1529-40.
- Matser JT, Kessels AGH, Jordan BD, Lezak MD , Troost J. Chronic traumatic brain injury in professional soccer players. *Neurology* 1998; 51(3): 791–796.
- McKee AC, Cantu RC, Nowinski CJ, Hedley-Whyte ET, Gavett BE, Budson AE, Santini VE, Lee HS, Kubilus CA , Stern RA. Chronic traumatic encephalopathy in athletes: Progressive tauopathy after repetitive head injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; 68(7): 709-35.
- Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18(13): 2626–2634.
- Moon Ian K. Interrogation of telomerase structure and function with telomeric DNA. Diss. The University of North Carolina at Chapel Hill, 2007.
- Morgan CP, Shetty AC, Chan JC, Berger DS, Ament SA, Epperson CN , Bale TL. Repeated sampling facilitates within- and between-subject modeling of the human sperm transcriptome to identify dynamic and stress-responsive sncRNAs. *Sci. Rep.* 2020; 10(1):.
- O’Callaghan NJ , Fenech M. quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol. Proced. Online* 2011; 13(1): 1–10.
- Ohhashi G, Tani S, Murakami S, Kamio M, Abe T , Ohtuki J. Problems in health management of professional boxers in Japan. *Br. J. Sports Med.* 2002; 36(5): 346–352.
- Ozkul Y, Taheri S, Bayram KK, Sener EF, Mehmetbeyoglu E, Öztop DB, Aybuga F, Tufan E, Bayram A, Dolu N, Zararsiz G, Kianmehr L, Beyaz F, Doganyigit Z,

- Cuzin F , Rassoulzadegan M. A heritable profile of six miRNAs in autistic patients and mouse models. *Sci. Rep.* 2020; 10(1): 1–14.
- Panara K, Masterson JM, Savio LF , Ramasamy R. Adverse Effects of Common Sports and Recreational Activities on Male Reproduction. *Eur. Urol. Focus* 2019; 5(6): 1146–1151.
- Pellman EJ, Viano DC, Tucker AM, Casson IR, Waeckerle JF, Maroon JC, Lovell MR, Collins MV, Kelly DF, Valadka AB, Cantu RC, Bailes JE , Levy ML. Concussion in professional football: Reconstruction of game impacts and injuries. *Neurosurgery* 2003; 53(4): 799–814.
- Pentelényi T. Significance of endocrine studies in the general assessment and prediction of fatal outcome in head injury. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien).* 1992; 55 21–24.
- Qiu J, Qian Y, Chen V, Guan MX , Shen B. Human Exonuclease 1 Functionally Complements Its Yeast Homologues in DNA Recombination, RNA Primer Removal, and Mutation Avoidance. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(25): 17893–17900.
- Rabadi MH , Jordan BD. The cumulative effect of repetitive concussion in sports. *Clin. J. Sport Med.* 2001; 11(3): 194–198.
- Rao X, Lai D , Huang XA new method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *J. Comput. Biol.* 2013; 20(9): 703–711.
- Rassoulzadegan M, Sharifi-Zarchi A , Kianmehr L. Dna-rna hybrid (R-loop): From a unified picture of the mammalian telomere to the genome-wide profile. *Cells* 2021; 10(6).
- Roake CM , Artandi SE. Approaching TERRA Firma: Genomic Functions of Telomeric Noncoding RNA. *Cell* 2017; 170(1): 8–9.
- Rodgers AB, Morgan CP, Leu NA , Bale TL. Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015; 112(44): 13699–13704.
- Sabet N, Soltani Z , Khaksari M. Multipotential and systemic effects of traumatic brain injury. *J. Neuroimmunol.* 2021; 357(May): 577619.
- Saretzki G. Telomeres, telomerase and ageing. *Subcell Biochem*, 2018; 90: 221-308
- Shalev I , Hastings WJ. Psychological Stress and Cellular Aging. *Oxford Res. Encycl. Psychol.* 2017.
- Sharma U, Conine CC, Shea JM, Boskovic A, Derr AG, Bing XY, Belleannee C,

- Kucukural A, Serra RW, SunF, Song L, Carone BR, Ricci EP, Li XZ, Fauquier L, Moore MJ, Sullivan R, Mello CC, Garber M , Rando OJ. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science* (80-. ). 2016; 351(6271): 391–396.
- Smith SM , Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2006; 8(4): 383–395.
- Stoller P. Chapter 24. Sorcerer’s Burd. 2016; 1672 139–144.
- Stroik S, Kurtz K, Lin K, Karachenets S, Myers CL, Bielinsky AK , Hendrickson EA. EXO1 resection at G-quadruplex structures facilitates resolution and replication. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(9): 4960–4975.
- Taheri S, Karaca Z, Rassoulzadegan M, Mehmetbeyoglu E, Zararsiz G, Sener EF, Bayram KK, Tufan E, Sahin MC, Marasli MK, Memis M, Canatan H, Ozturk F, Tanriverdi F, Unluhizarci K , Kelestimur F. The Characterization of Sex Differences in Hypoglycemia-Induced Activation of HPA Axis on the Transcriptomic Level. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2021; 5.
- Tanriverdi F, Unluhizarci K , Kelestrimur F. Persistent neuroinflammation may be involved in the pathogenesis of traumatic brain injury (TBI)-induced hypopituitarism: Potential genetic and autoimmune factors. *J. Neurotrauma* 2010; 27(2): 301–302.
- Tayebi M, Holdsworth SJ, Champagne AA, Douglan J, Nielsen P, Lee T, Wang A, Fernandez J, ShimV, Tayebi M, Holdsworth SJ, Champagne AA, Cook J, Nielsen P, Lee T, Wang A, Fernandez J , The V. S. The role of diffusion tensor imaging in characterizing injury patterns on athletes with concussion and subconcussive injury : a systematic review. *Brain Inj.* 2021; 00(00): 1–24.
- Teasdale G , Jennett B. Assessment of Coma And Impaired Consciousness. *Lancet* 1974; 304(7872): 81–84.
- Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ , Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil. Steril.* 1984; 42(1): 87–91.
- Tremblay S, De Beaumont L, Henry LC, Boulanger Y, Evans AC, Bourgouin P, Poirier J, Théoret H , Lassonde M. Sports concussions and aging: A neuroimaging investigation. *Cereb. Cortex* 2013; 23(5): 1159–1166.

- Tucker LB, Fu AH , McCabe JT. Performance of male and female C57BL/6J mice on motor and cognitive tasks commonly used in pre-clinical traumatic brain injury research. *J. Neurotrauma* 2016; 33(9): 880–894.
- Van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature* 2014; 509(7501): 439–446.
- Vasile E, Tomita Y, Brown LF, Kocher O , Dvorak HF. Differential expression of thymosin  $\beta$ -10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB J.* 2001; 15(2): 458–466.
- Wall SE, Williams, WH, Cartwright-Hatton S, Kelly TP, Murray J, Murray M, Owen A , Turner M. Neuropsychological dysfunction following repeat concussions in jockeys. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2006; 77(4): 518–520.
- Wang C, Zhao L , Lu S. Role of TERRA in the regulation of telomere length. *Int. J. Biol. Sci.* 2015.
- Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav.* 2008; 32(6): 1073-86.
- Werner C , Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *BJA Br. J. Anaesth.* 2007; 99(1): 4–9.
- Wong JMY , Collins K. Telomere maintenance and disease. *Lancet.* 2003; 362(9388): 983–988.
- Xu X, Miao Z, Sun M , Wan B. Epigenetic Mechanisms of Paternal Stress in Offspring Development and Diseases. *Int J Genomics* . 2021; 6632719.
- Zemper ED. Two-year prospective study of relative risk of a second cerebral concussion. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 2003; 82(9): 653–659.
- Zhang L, Ravdin LD, Relkin N, Zimmerman RD, Jordan B, Lathan WE , Uluğ AM. Increased diffusion in the brain of professional boxers: A preclinical sign of traumatic brain injury? *Am. J. Neuroradiol.* 2003; 24(1): 52–57.

# TRAVMATİK BEYİN HASARI (TBH)'NIN PATERNAL GENOM ÜZERİNE ETKİSİ- MEHMET MEMİŞ

ORJİNALLİK RAPORU

%21

BENZERLİK ENDEKSİ

%3

İNTERNET KAYNAKLARI

%1

YAYINLAR

%19

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

|   |                                                                                                               |     |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1 | Submitted to Erciyes Üniversitesi<br>Öğrenci Ödevi                                                            | %19 |
| 2 | Submitted to Trakya University<br>Öğrenci Ödevi                                                               | <%1 |
| 3 | vs1.doczz.cz<br>İnternet Kaynağı                                                                              | <%1 |
| 4 | paperity.org<br>İnternet Kaynağı                                                                              | <%1 |
| 5 | www.agrifoodscience.org<br>İnternet Kaynağı                                                                   | <%1 |
| 6 | www.anatoljfm.org<br>İnternet Kaynağı                                                                         | <%1 |
| 7 | sualti.org<br>İnternet Kaynağı                                                                                | <%1 |
| 8 | "POSTER SUNUM ÖZETLERİ / POSTER<br>PRESENTATION ABSTRACTS", Turkish Journal<br>of Biochemistry, 2017<br>Yayın | <%1 |



Tarih: 06.01.2021

Toplantı Sayısı: 01

Karar No:21/18

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 06.01.2021 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

| Üye Adı/Soyadı      | Ünvanı                       | Bölümü                                        |
|---------------------|------------------------------|-----------------------------------------------|
| Gültekin ATALAN     | Prof. Dr.                    | Veteriner Fakültesi                           |
| Coşkun TEZ          | Prof. Dr.                    | Fen Fakültesi                                 |
| Vehbi GÜNEŞ         | Prof. Dr.                    | Veteriner Fakültesi                           |
| Füsun Ferda ERDOĞAN | Prof. Dr.                    | Tıp Fakültesi                                 |
| Yusuf KONCA         | Prof. Dr.                    | Ziraat Fakültesi                              |
| Ahmet ÖZTÜRK        | Prof. Dr.                    | Tıp Fakültesi                                 |
| M. Betül AYCAN      | Prof. Dr.                    | Eczacılık Fakültesi                           |
| Ayşe EKEN           | Prof. Dr.                    | Eczacılık Fakültesi                           |
| Zühal HAMURCU       | Doç. Dr.                     | Tıp Fakültesi                                 |
| Sezer DEMİRBUĞA     | Doç. Dr.                     | Diş Hekimliği Fakültesi                       |
| İbrahim KARAMAN     | Doç. Dr.                     | Tıp Fakültesi                                 |
| Çağrı Çağlar SİNMEZ | Doç. Dr.                     | Veteriner Fakültesi                           |
| Zeynep CAFEROĞLU    | Dr.Öğr.Üyesi                 | Sağlık Bilimleri Fakültesi                    |
| Eray AKTUĞ          | Arş. Gör. Dr.                | Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜTAI |
| Umut ALPMAN         | Arş. Gör.                    | Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)           |
| Mustafa ERMİŞ       | Veteriner Hekim              | Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.   |
| Ali KOÇ             | Kurumla İlişkisi Olmayan Üye | Sivil Üye                                     |
| Mehmet TAV          | Dernek Üyesi (Avukat)        | Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi              |

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.'dan Doç.Dr.Serpil TAHERİ tarafından sunulan "Travmatik Beyin Hasarı (TBH)'nın Paternal Genom Üzerine Etkisi" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

**Sayı:** 68742022- 604.01.02-013  
**Konu:**Değerlendirme ve Onay

13/01/2021

**Sayın; Doç.Dr.Serpil TAHERİ**

**“Travmatik Beyin Hasarı (TBH)’nın Paternal Genom Üzerine Etkisi”** başlıklı projenizin Merkezimiz Genom Birimi’ nde gerçekleştirilmesi uygun bulunmuştur. Bilgilerinize rica ederim.

**Not: Bu projeden çıkan bütün yayınlarınızda projenin Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezinde yapıldığına dair ibarenin kullanılması zorunludur.**

**Kullanım şekli: “Erciyes University Genome and Stem Cell Center (GENKOK)**

**Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi**

Erciyes Üniversitesi Merkez Kampüsü / 38039 Kayseri / TÜRKİYE Telefon: +90 352 207 66 66 / 13 600 Telefon: +90 352 437 93 15  
Faks: +90 352 437 93 16 E-mail: info@genkok.com E-mail: genkok@erciyes.edu.tr Web: www.genkok.com

# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı, Soyadı:** Mehmet MEMİŞ

**Uyruğu:** T.C.

## EĞİTİM

| Derece        | Kurum                                                                                                                   | Tarih     |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Yüksek Lisans | Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, KAYSERİ | 2019-2021 |
| Lisans        | Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, BURSA                                  | 2015-2019 |
| Ön lisans     | Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi, Adalet, ESKİŞEHİR                                                           | 2015-2018 |
| Lise          | Bayburt Anadolu Lisesi, BAYBURT                                                                                         | 2011-2015 |

## YABANCI DİL

İngilizce

## YAYINLAR

Taheri S, Karaca Z, Rassoulzadegan M, Mehmetbeyoglu E, Zararsiz G, Sener EF, Bayram KK, Tufan E, Sahin MC, Marasli MK, **Memis M**, Canatan H, Ozturk F, Tanriverdi F, Unluhizarci K, Kelestimur F. The Characterization of Sex Differences in Hypoglycemia-Induced Activation of HPA Axis on the Transcriptomic Level. Cell Mol Neurobiol. 2021 Feb 5. doi: 10.1007/s10571-021-01043-0. Epub ahead of print. PMID: 33544274.