T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

İNFERTİL ERKEKLERDE METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR) C677T VE A1298C GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Atıf KOÇER

Danışman
Prof.Dr. Munis DÜNDAR

Yüksek Lisans Tezi

Mart 2018
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

İNFERTİL ERKEKLERDE METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR) C677T VE A1298C GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Atıf KOÇER

Danışman
Prof.Dr. Munis DÜNDAR

Mart 2018
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Atıf KOÇER

YÖNERGEYE UYGUNLUK

''İnfertil Erkeklerde Metilentetrahidrofolat Redüktaz(MTHFR) C677T ve A1298C Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması'' adlı Yüksek tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Atıf KOÇER

İmza

Danışman

Prof.Dr. Munis DÜNDAR

İmza

Kök Hücre ABD Başkanı

Prof.Dr. Yusuf ÖZKUL

İmza

KABUL VE ONAY SAYFASI

Prof.Dr. Munis DÜNDAR danışmanlığında **Atıf KOÇER** tarafından hazırlanan **"İnfertil Erkeklerde Metilentetrahidrofolat Redüktaz(MTHFR) C677T ve A1298C Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

09 /03 / 2018

JÜRİ:

Danışman: Prof.Dr. Munis DÜNDAR (Erciyes Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL (Erciyes Üniversitesi)

Üye: Doç. Dr. Ahmet Okay ÇAĞLAYAN (İstanbu Bilim Üniversitesi)

ONAY:

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

...../...../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında benden hiçbir konuda desteğini esirgemeyen ve çalışmalarımı yönlendiren çok kıymetli hocam sayın Prof.Dr.Munis DÜNDAR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na ilk geldiğim günden beri yardım ve desteklerini benden esirgemeyen hocalarım sayın Prof.Dr.Yusuf ÖZKUL ve sayın Prof.Dr.Çetin SAATÇİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tıb Faktültesi Üroloji Anabilim Dalı'ndaki sayın Prof.Dr.Oğuz EKMEKÇİOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmalarımda yardımını benden esirgemeyen Hilal AKALIN ve tüm bölüm çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisansa başladığım günden beri maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

AZİZ TÜRK MİLLETİNE, KAHRAMAN ŞEHİTLERİMİZE ve KAHRAMAN GAZİLERİMİZE en içten saygı ve sevgi ile teşekkür ederim.

ATIF KOÇER

KAYSERİ, MART 2018

İNFERTİL ERKEKLERDE METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR) C677T VE A1298C GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Atıf KOÇER

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Mart 2018

Danışman: Prof. Dr. Munis DÜNDAR

ÖZET

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) 677C→T ve (MTHFR) 1298A→C genleri folat metobolizmasının anahtar rolü oynayan genlerindendir. İnsan MTHFR geni kromozom 1p36.3'de lokalizedir ve 563 amino asitten oluşan MTHFR enzimini kodlamaktadır. MTHFR geninde 677C→T ve 1298A→C polimorfizmleri en yaygın görülen polimorfizmlerdir.

Bu çalışmada 53 belirsiz azospermi, 55 nonobstrüktif azospermi, 62 obstrüktif azospermi, 51 oligosipermi ve 57 CABVD infertil erkelerin DNA örnekleri alınmıştır. 63 fertil erkekten(çocuk sahibi) edilen DNA örnekleri de kontrol amaçlı olarak alınmıştır. MTHFR geninde 677C→T ve 1298A→C polimorfizmleri PCR ve RFLP analizi yapılarak belirlendi.

Erkek infertil grublarda(belirsiz azospermi, nonobstrüktif azospermi, obstrüktif azospermi, oligospermi ve CABVD) MTHFR 677CC, 677CT, 677TT genotipleri sırasıyla %47.17, %39.62, %13.21; %49.10, %43.63, %7.27; %43.54, %46.78, %9.68; %50.98, %33.33, %15.69; %49.12, %40.35, %10.53 kontrol grubunda %53.97, %38.10, %7.93 bulunmuştur. Erkek infertil grublarda(belirsiz azospermi, nonobstrüktif azospermi, obstrüktif azospermi, oligospermi ve CABVD) MTHFR 1298AA, 1298AC, 1298CC genotipleri sırasıyla %49.06, %43.40, %7.54; %43.64, %45.46, %10.90; %46.77, %43.55, %9.68; %52.94, %37.25, %9.81; %49.12, %38.60, %12.28 kontrol grubunda %50.80, %42.85, %6.35 bulunmuştur. Bu bulgular erkek infertilitesinde MTHFR 677C→T ve MTHFR 1298A→C polimorfizmlerinin önemli olmadığına işaret etmektedir. Fakat bu genlerin polimorfizimlerinin folat düzeyleriyle ilişkilerinin incelendiği daha geniş hasta grubundaki çalışmaların bizim görüşümüzü destekler nitelikte olacağı kanısındayız.

Anahtar kelimeler: MTHFR, polimorfizm, erkek infertilitesi, C677T, A1298C

INVESTIGATION OF METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTAZ (MTHFR) C677T AND A1298C GEN POLYMORPHISM IN INFERTILE MALE

Atıf KOÇER

Erciyes University, Institute of Health Sciences Department of Stem Cells

Master Thesis, March 2018

Supervisor:Prof.Dr. Munis DÜNDAR

ABSTRACT

Both methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→T and (MTHFR) 1298A→C are genes play key role in folate metobolism. Human MTHFR gene is localized to chromosome 1p36.3 and coded MTHFR enzyme which consists of 563 amino acids. The most common polymorphisms are MTHFR 677C→T and 1298A→C polymorphisms.

In this study, 53 indeterminate azoospermia, 55 nonobstructive azoospermia, 62 obstructive azoospermia, 51 oligosipermia and 57 CABVD infertile DNA samples were taken. DNA samples from 63 fertile men (child-bearing) were also taken for control purposes. 677C→T and 1298A→C polymorphisms in the MTHFR gene were determined by PCR and RFLP analysis.

The genotypes of MTHFR 677CC, 677CT, 677TT in male infertile groups (ambiguous azoospermia, nonobstructive azoospermia, obstructive azoospermia, oligospermia and CABVD) were 47.17%, 39.62%, 13.21%; 49.10%, 43.63%, 7.27%; 43.54%, 46.78%, 9.68%; 50.98%, 33.33%, 15.69%; 49.12%, 40.35%, 10.53% in the control group, 53.97%, 38.10%, 7.93% respectively.Genotypes of MTHFR 1298AA, 1298AC, 1298CC in male infertile groups (ambiguous azoospermia, nonobstructive azoospermia, obstructive azoospermia, oligospermia and CABVD) were 49.06%, 43.40%, 7.54%; 43.64%, 45.46%, 10.90%; 46.77%, 43.55%, 9.68%; 52.94%, 37.25%, 9.81%; 49.12%, 38.60%, 12.28% in the control group, 50.80%, 42.85%, 6.35% respectively. These findings indicate that MTHFR 677C → T and MTHFR 1298A → C polymorphisms are not important in male infertility. But the possible association of this gene polymorphisms with the folate levels, merits further study in larger populations and we think that this further studies will support our idea.

Key words: MTHFR, polymorphisms, male infertility, C677T, A1298C

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i

YÖNERGEYE UYGUNLUK ii

KABUL VE ONAY SAYFASI iii

TEŞEKKÜR iv

ÖZET v

ABSTRACT vi

İÇİNDEKİLER vii

KISALTMALAR ve SİMGELER xi

TABLOLAR LİSTESİ xii

ŞEKİLLER LİSTESİ xiii

1.GİRİŞ VE AMAÇ 1

2.GENEL BİLGİLER 4

2.1. İNFERTİLİTE 4

2.1.1. Erkek İnfertilitesi 4

2.1.1.1.Erkek İnfertilitesinin İnsidansı ve Prevalansı 5

2.1.1.2.Erkek İnfertilitesinin Etyolojisi 6

2.1.1.3.Erkek İnfertilitesinde Genetik Nedenler 7

2.1.1.3.1.Kromozom Bozuklukları 8

2.1.1.3.2.Y-Kromozom İnfertilitesi(Y Kromozomunun Mikrodelesyonu) 8

2.1.1.4. Azoospermi 9

2.1.1.4.1. Pre-Testiküler Azoospermi 10

2.1.1.4.2. Post-Testiküler Tıkanıklık veya Obstrüktif Azoospermi (OA) 10

2.1.1.4.3. Obstrüktif Olmayan Azoospermi (NOA) 10

2.1.1.5. Konjenital bilateral vas defferens yokluğu (CBAVD) ... 10

2.1.1.6. Oligospermi ... 11

2.1.1.7. Astenospermi ... 11

2.1.1.8.Nekrospermi ... 12

2.1.1.9. Teratospermi ... 12

2.1.1.5. Mitokondri DNA mutasyonları ... 13

2.1.1.6. Monogenik Bozukluklar ... 13

2.1.1.7. Multifaktöriyel Bozukluklar ... 13

2.2. METİLASYON ... 14

2.2.1.Protein Metilasyonu. ... 14

2.2.2. DNA Metilasyonu ... 14

2.2.3.Metilasyon Mekanizmasında Görev Alan Moleküller Metiltransferazlar ... 15

2.2.3.1. S-Adenozil Metiyonin (SAM) ... 15

2.2.4. Metilasyonun Fonksiyonları. ... 16

2.3. FOLAT METABOLİZMASI ... 17

2.3.1.Metilentetrahidrofolat Redüktaz.(MTHFR) Enziminin Yapısı ve Görevi ... 17

2.3.2. Homosistein ... 19

2.4.Metilasyon Mekanizmasındaki Bozukluklar ve İlişkili Hastalıklar ... 19

2.5.POLİMORFİZM ... 20

2.5.1 Genetik Polimorfizim Kavramı ... 21

2.5.2. Tıbbı Genetikte Polimorfizimlerin Kullanımı ... 22

2.6. MTHFR ... 22

2.6.1.Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Geninin Yapısı ve Özellikleri ... 23

2.6.2 MTHFR Polimorfizimleri ... 23

2.6.2. MTHFR Eksikliği ... 26

2.6.3. MTHFR Popülasyon Sıklıkları 26
2.6.4. MTHFR A1298C ve C677T Mutasyonlarının Kombinasyonu 27
2.6.5. MTHFR'nin Farklı Populasyonlarda Gözlemlenmesi 28
2.6.6. MTHFR Genotip Kombinasyonları 28
2.7. Mutasyon Analizlerinde Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler 29
2.7.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 29
2.7.2. Agaroz Jel Elektrofezi 32
2.7.3. Sınırlandırılmış Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP) 33
3. GEREÇ VE YÖNTEM 35
3.1. GEREÇLER 35
3.1.1. Demirbaş Malzemeler 35
3.1.2.Sarf Malzemeler 35
3.2.YÖNTEMLER 36
3.2.1. DNA Örneklerinin Toplanması 36
3.2.2. METOD 36
3.2.3. Moleküler Çalışma Basamakları 36
3.2.3.1.PCR 36
3.2.3.1.1. MTHFR 677C→T PCR Programı 37
3.2.3.1.2. MTHFR 1298A→C PCR Programı 37
3.2.3.2.1.Agaroz Jel Hazırlanması 38
3.2.3.2.1.1. %2'lik Agaroz Jel Hazırlanması 38
3.2.3.3. PCR Ürününün Agaroz Jele Yüklenmesi 38
3.2.3.4.MTHFR 677 C→T Polimorfizim Analizi Enzim Muamelesi 38
3.2.3.5. Elektroforez İşlemi 38
3.2.3.6.MTHFR 1298 A→C Polimorfizim Analizi Enzim Muamelesi 38

3.2.3.7. Elektroforez İşlemi 39
4.BULGULAR 40
4.1.PCR BULGULARI 40
4.2.RFLP Analizi 40
4.2.1.MTHFR 677C→T Polimorfizimi 40
4.2.2.MTHFR 1298 A→C Polimorfizimi 41
5.TARTIŞMA VE SONUÇ 44
6.KAYNAKLAR 50
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

MTHFR :Metilentetrahidrofolat redüktaz

SAM : S-adenozilmetiyonin

SAH : S-adeozil homosistein

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

AZF : Azoospermi faktörü

ATP : Adenozin trifosfat

CFTR: Kistik fibrozis transmembran düzenleyenleyicisi

DNA : Deoksiribo nükleik asit

DAZ : Delet azoospermia

ICSI : İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu

OA : Obsrüktif azoospermi

NOA : Obsrüktif olmayan azoospermi

CABVD :Konjenital bilateral vas defferens yokluğu

HOS : Hipo ozmotik şişme testi

STFT : Sperm kuyruk esneklik testi

DNMT :DNA Metiltransferans

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizmleri için kullanılan primer dizileri 37

Tablo 4.1.MTHFR 677C→T Polimorfiziminin erkek infertil grublar ve kontrol gruplarında karşılaştırılması 43

Tablo 4.2. MTHFR 1298A→C Polimorfiziminin erkek infertil grublar ve kontrol gruplarında karşılaştırılması 43

Tablo 5.1 Farklı ülkelerdeki Kafkas kökenli ve Asya kökenli erkekler üzerinde yapılan MTHFR 677CT ve 1298AC polimorfizm çalışmalarının meta-analizi sonuçları 47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. İnfertilite dağılımı 5

Şekil 2.2. Erkek infertilitesi bozukluklarının dağılımı 6

Şekil 2.3. Erkek faktörü infertilitesinin genetik nedenleri 7

Şekil 2.4. Y kromozomunun fertilite ve infertilite ile ilişkili olan bölgeleri 9

Şekil 2.5. DNA metilasyonu mekanizması 16

Şekil 2.6. Metilasyon ve ilişkili olduğu hastalıklar 20

Şekil 2.7. MTHFR (Metilentetrahidrofolat redüktaz) geninin lokalizasyonu 22

Şekil 2.8. MTHFR (Metilentetrahidrofolat redüktaz) 677C\T Polimorfizmi 24

Şekil 2.9. (PCR) Polimeraz Zincir Reaksiyonu Cihazı 29

Şekil 2.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR) Sıcaklık Değişimleri 31

Şekil 2.11. Agaroz Jel Elektroforezi Cihazı 32

Şekil 2.12. Agaroz Jel Elektroforezi Jel Görüntüsü 33

Şekil 4.1. MTHFR 677 C→T 1298 A→C %2'lik agoroz jel görüntüsü. 40

Şekil 4.2. MTHFR 677 C→T Polimorfizminin %3'lik agoroz jel görüntüsü. 41

Şekil 4.3. MTHFR 1298A→C Polimorfizminin %3'lik agoroz jel görüntüsü. 42

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite(kısırlık), çiftlerin korunmadan düzenli cinsi ilişkisine rağmen bir yıl da gebelik elde edememesi durumudur. Çiftlerin en az %15'ini etkileyen infertilite; yaklaşık %30 kadın, %30 erkek kaynaklı olarak karşımıza çıkmaktadır (1,2,3). Bütün infertilite olgularının yaklaşık %25'inde ise gösterilebilir bir neden bulunamaz ve bu duruma "açıklanamayan infertilite" denir (2,4,5).

Açıklanamayan infertilite tanısı konan çiftlerin en az yarısında erkeğe ait bulunamamış bir neden olduğu düşünülebilir. Bu durumu erkek subfertilitesi olarak adlandırmak yerinde olacaktır (2,6,7).

Erkek fertilitesi oldukça karmaşık bir kavramdır. Söz konusu erkek subfertilitesi olduğunda, sperm sayı ve morfolojisi göz önünde bulundurularak yapılan, standart değerlendirme yetersiz kalmaktadır (6,8,9,10,).

Bugün başarılı bir gebelik elde etmek için, normal bir spermiogramdan fazlasına ihtiyaç olduğunu gösteren bilimsel kanıtlar mevcuttur (11,12,13,14). Spermatogenez ve fertilizasyonda görev alan binlerce gen bulunmaktadır. Bu genlerle ilgili en küçük bir anomali bile sperm kalitesinde ciddi bozulmalara neden olmaktadır (9,11,12,15). Yine de sperm kalitesi bozulmadan sperm fonksiyonunun bozuk olduğu durumlar bulunmaktadır. Spermin fonksiyonu; taşıdığı genetik koda olduğu kadar, bu bilginin ifadelenmesine de bağlıdır (10,13,16).

Epigenetik değişiklikler, bir genin; DNA sekansında herhangi bir değişiklik olmaksızın; ekspresyonunu etkileyen bölgesel ve geçici değişikliklerdir. Epigenetik özellikler, bireye özgü ve dinamik değişiklikler olsa da aynı zamanda soya aktarılabilir. Epigenetik mekanizmalar içerisinde en önemlisi DNA metilasyonudur. Genellikle genlerin promotorunda bulunan CpG adalarında meydana gelen metilasyon, ilgili genin ifadesinin azalmasına neden olur (17,18,19).

Türe ve dokuya son derece özgü olan sperm epigenomu, hem fertilizasyon başarısı hem de erken embriyogenezde kritik bir önem taşımaktadır (8,18,20,21). Sperm metilasyon anomalilerinin idiopatik erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (11,18,24,26). Folat metabolizmasıyla ilgili genlerdeki mutasyonlar erkek infertilitesi ile ilişkilidir (15,17,29,30). Folat düzeyinin azalması ya da hücre düzeyinde kullanım bozukluğu, DNA sentez yetersizliği ve hiperhomosisteinemiye, bunun devamında da oksidatif strese ve metilasyonun daha da azalmasına yol açabilir (3,15,17,29,30) .

Metilentetrahidrofolatredüktaz (MTHFR), folat metabolizmasında yer alan ve DNA'nın hem sentezi hem de metilasyonu için gereken metil gruplarının sağlanmasında görevli en önemli enzimdir. İlginç olarak MTHFR geninin kendisi de metilasyonla düzenlenir (18,22,27). MTHFR geni düzgün çalışmaması durumunda diğer pek çok bozukluğun yanı sıra global metilasyon yetersizliğine yol açacak önemli bir gendir. Daha önce MTHFR gen polimorfizmi ve promotor hipermetilasyonunun idiopatik erkek infertilitesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (19,21).

MTHFR gen polimorfizmi üzerine yapılan bir çok çalışma, kolon kanseri, lösemi, şizofreni, migren, Down sendromu ve diğer nörolojik bozukluklarla ilişkisini ortaya koymuştur (8,12). İnfertilitenin MTHFR gen varyasyonları ile ilişkisi üzerine araştırmalar da Afrika, Amerika, İspanya, Avrupa, Romanya ve Hint nüfuslarında yapılan bir değişikliğin, diğer popülasyonlarda değil, Romanya ve Hindistan'daki popülasyonlarda spermatogenez üzerine etkileri ile homosistein düzeylerini düşürdüğünü gösterdi(13,14,20). Amerika Birleşik Devletleri'ndeki nüfusun çoğunda homozigot dominant genotip bulunur: İnfertil erkekler arasında Romen nüfusunda homozigot resesif genotip % 35.7 bulunmuştur.

MTHFR gen mutasyonu, germ hücrelerinin inaktivasyonuna neden olur ve sonunda spermatogenik arreste neden olur. Reprodüktif dokularda oksidatif durumun artışı da sperm hücrelerindeki DNA hasarının bir sonucu olarak gösterildi (22,23,26,27,30).Polimorfizmin ırk tarafından etkilentiği bilinmektedir. Bu nedenle, Türk nüfusunda MTHFR gen polimorfizminin frekans ve dağılımının ve bu genin varyasyonunun infertil erkeklerde spermatogenezi etkileyip etkilemediğini bilmeliyiz. Bu veriler infertil erkeklerin tedavisinde ve yardımcı programı aracılığıyla çocuk sahibi olmak isteyen infertil erkekler için bir çözüm sağlayabilir (6,21,22,23,25,28).

Bu çalışmada, infertil erkeklerde MTHFR C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmlerinin Türk toplumunda sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

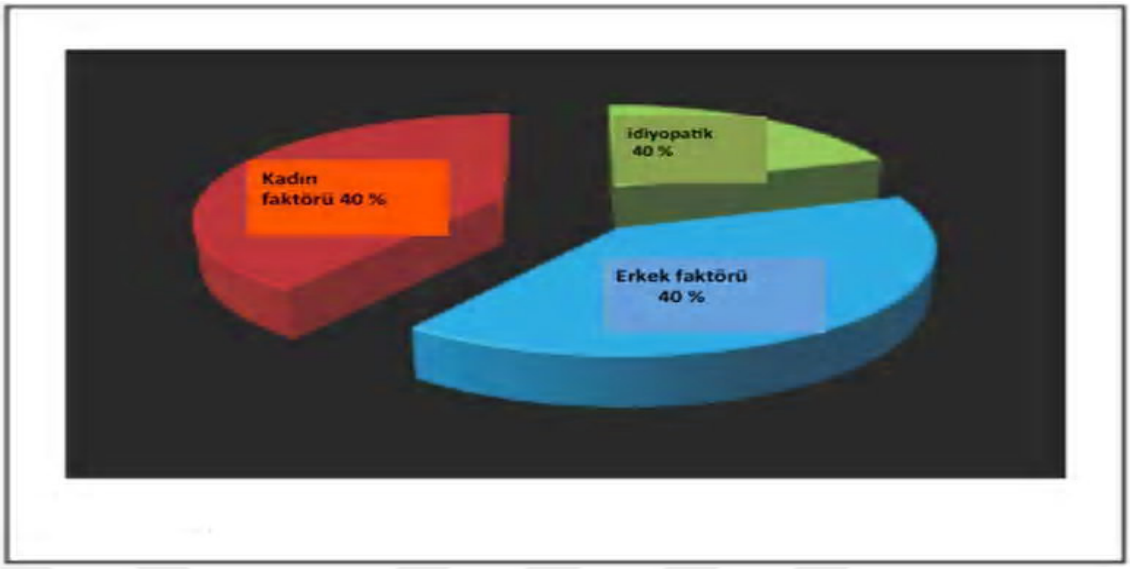
2.GENEL BİLGİLER

2.1. İNFERTİLİTE

İnfertilite(kısırlık), çiftlerin korunmadan düzenli cinsi ilişkisine rağmen bir yıl da gebelik elde edememesi durumudur (22,23). Dünya çapında reprodüktif yaşta olan çiftlerin yaklaşık %13-18'i ırk ve etnik grubu dikkate almaksızın infertiliteden etkilenmektedir (24). İnfertilite her ne kadar hayatı tehdit eden bir durum olmasa da sosyal damgalanma (stigma) ile ilişkili yoğun toplumsal baskı ve ebeveyn baskısıyla sonuçlanan travmatik bir durumdur (25).

2.1.1. Erkek İnfertilitesi

İnfertilite(kısırlık), gebeliğin hiç oluşmadığı durumda primer ve daha önce gebelik oluşmuş fakat sonra istendiği halde tekrar gebelik oluşamıyorsa sekonder olarak tanımlanmaktadır. Hastaların %67-71'inde birincil infertilite ve %29-33'ünde ikincil infertilite görünmektedir (34). İnfertilitede erkek faktörü, olguların yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Bu %50'lik erkek faktörü infertilite grubu ise genellikle %30 erkek kaynaklı nedenlerle, %20 hem kadın hem de erkek kaynaklı nedenlerle olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (23,26). (şekil 2.1)(27)



Şekil 2.1. İnfertilite dağılımı (36)

2.1.1.1.Erkek İnfertilitesinin İnsidansı ve Prevalansı

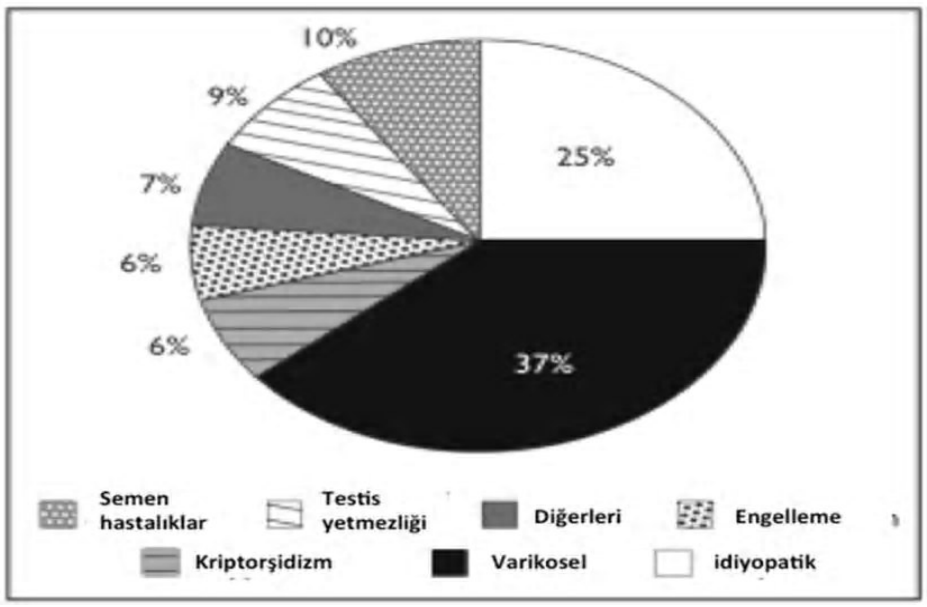
İnfertilitenin(kısırlığın) sıklığı açıkça kullanılan tanıma bağlı olmaktadır. Yaygın klinik uygulama ve pek çok çalışmada infertilite(kısırlık), çiftlerin korunmadan düzenli cinsi ilişkisine rağmen bir yıl da gebelik elde edememesi durumu olarak tanımlanmasına rağmen, bazı araştırmacılar 'normal' popülasyonda gözlemlenen doğurganlık dağılımına dayanarak infertiliteyi korunmasız cinsi ilişkisine rağmen yirmi dört ay boyunca gebe kalınamaması durumudur diye tanımlamışlardır(1,25,27,34). Çalışmaların pek çoğunda infertilite prevalansı ya klinik tabanlıdır ya da nüfus örneklerine dayanmaktadır. Klinik tabanlı çalışmalara sadece medikal yardım alan erkekler dâhil olduğu için subfertilitenin yaygınlığı göz ardı edilmektedir. Benzer bir şekilde infertilite(kısır) sayılabilmesi için daha uzun zaman (2 yıl) tanımlayan çalışmalarda prevalans oranının düşük olması beklenmektedir (37). Son yayımlanan çalışmalarda, infertilite prevalansı olarak genelde tüm evli çiftlerin %14'ü kabul edilir. Klinik tabanlı çalışmalarda çiftlerin çoğu birincil infertilite göstermesine rağmen, populasyon tabanlı çalışmalarda ikincil infertil erkeklerin eşit ya da daha fazla oldukları gösterilmiştir (38). Bu durum, iki grup arasında sağlık hizmetleri alımındaki farklılıkları yansıtmaktadır (39).

Ayrıca infertil(kısır) çiftlerin arasında, erkek infertilite yaygınlığının coğrafi varyasyona bağlı olduğu gösterilmiştir. Fransa'da yüksek bir ortalamada, yaklaşık %59; Hindistan'ın Keşmir Vadisi'nde ve İngiltere'de %26-32; Güney Afrika, Endonezya ve Finlandiya'da %36 oranında görülmektedir (40). Sunulan mevcut raporlar etnik, iklim,

mesleki farklılıklar gibi etkenlerin ortalama sperm konsantrasyonunu, kalitesini ,sayısını ve dolayısıyla erkek infertilitesini etkilediğini göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde infertilite sıklığının daha yüksek oranlarda seyretmesi ülkeler arasında önemli bir fark olarak tespit edilmiştir. Ülkeler arası oluşan fark tanı ve tedavi için ayrılan kaynaklarda eşitsizliğe bağlı olabilmektedir (35). Bu sonuçlara göre dünyada her yıl 60-80 milyon çift, 15-20 milyonu sadece Hindistan'da olmak üzere, infertiliteden (kısırlıktan) şikayetçi olmaktadırlar. Üreme sağlığını ilgilendiren bu durum önemli ulusal bir sorundur. Birçok vakada olduğu gibi infertilite önlenebilir durumda ise, bu problemin çözümü için zaman kaybetmeksizin harekete geçilmelidir (31).

2.1.1.2.Erkek İnfertilitesinin Etyolojisi

Erkek infertilitesi, hastalıkların majör bir bölümünü kapsayan çok faktörlü bir sendromdur. Erkek faktörü infertilite olgularının yaklaşık %37-58'inda bir neden bulunamamaktadır ve bu olgular idiyopatik olarak adlandırılır (22,28). Bu kategori erkek üreme fonksiyonunda kendiliğinden oluşan bir bozukluktan kaynaklanan ve nedeni bilinmeyen erkek infertilitesi olarak da adlandırılmaktadır (23). Bu olgular konjenital veya edinsel olabilmektedir. İnfertilitenin %10 kadar olan bölümü tıbbi olarak açıklanamamaktadır. Erkek infertilitesinin bilinen nedenleri oldukça fazladır ama yinede bir dizi ana gruba ayrılabilir. Erkek infertilite bozuklukları genetik ve genetik olmayan nedenler ile ilişkili olarak iki gruba ayrılabilir (şekil 2.2) (22,29,30).

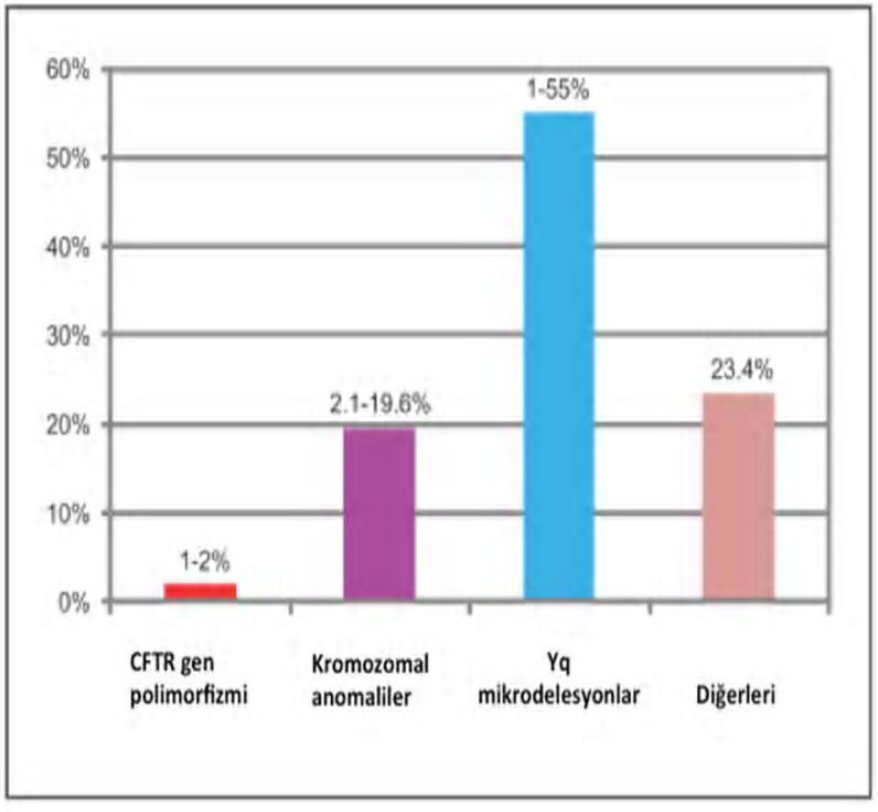


Şekil 2.2. Erkek infertilitesi bozukluklarının dağılımı (22)

İnfertil(kısır) erkeklerin sperm analizleri, azoospermi, oligozoospermi, teratozoospermi, astenozoospermi, nekrospermi ve pyospermi gibi birçok anormal durumda ortaya çıkabilmektedir. İnfertilite kliniğinden yardım isteyen erkeklerin yaklaşık %30'unda, oligozoospermi veya etiyolojisi bilinmeyen azoosperminin olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle erkek infertilite nedenlerini belirlemek hastalığın tedavisi açısından önemli bir ihtiyaçtır (22,30,32,33).

2.1.1.3.Erkek İnfertilitesinde Genetik Nedenler

Moleküler tekniklerin gelişmesi infertilite genetiğinde büyük ilerleme sağlamıştır. Ancak, erkek infertilitesinin genetik nedenlerinin belirlenmesi halen sınırlı kalmaktadır. Genetik anomaliler, açıklanamayan oligozoospermi ve azoospermi olan erkeklerde sayısal ve yapısal kromozom anomalileri olarak tespit edilmiştir. Kromozomal bozukluklar, Y kromozom mikrodelesyonları, (mtDNA) mitokondriyal DNA mutasyonları, multifaktöriyel hastalıklar, tek gen hastalıkları ve genetik kökenli endokrin bozukluklar gibi genetik faktörler şiddetli erkek infertilitesinin ~%10-15'ini etkilemektedir (22,34,35,36,37).



Şekil 2.3. Erkek faktörü infertilitesinin genetik nedenleri (38).

2.1.1.3.1.Kromozom Bozuklukları

İnsanlarda erkek infertilitesi genellikle kromozom anomalileri ile ilgilidir. Klinefelter sendromu (XXY) ve özgül translokasyonlar erkek infertilitesi nedenleri arasında yer almaktadır (39,40,41). Androjen reseptörü nokta mutasyonları ve CFTR (cystc fibrozis transmembrane conductance regülatör) geni mutasyonları yaygın olarak konjenital vaz deferens anomalileri ve spermatogenik bozukluklar ile ilişkili olan iki önemli gen defektidir (42). Erkek infertilitesinde en sık karşılaşılan durumlar ise sperm kromozomu anomalisi, mayoz mutasyonları veya testiküler mikroçevreden kaynaklanan bir diploididir (22).

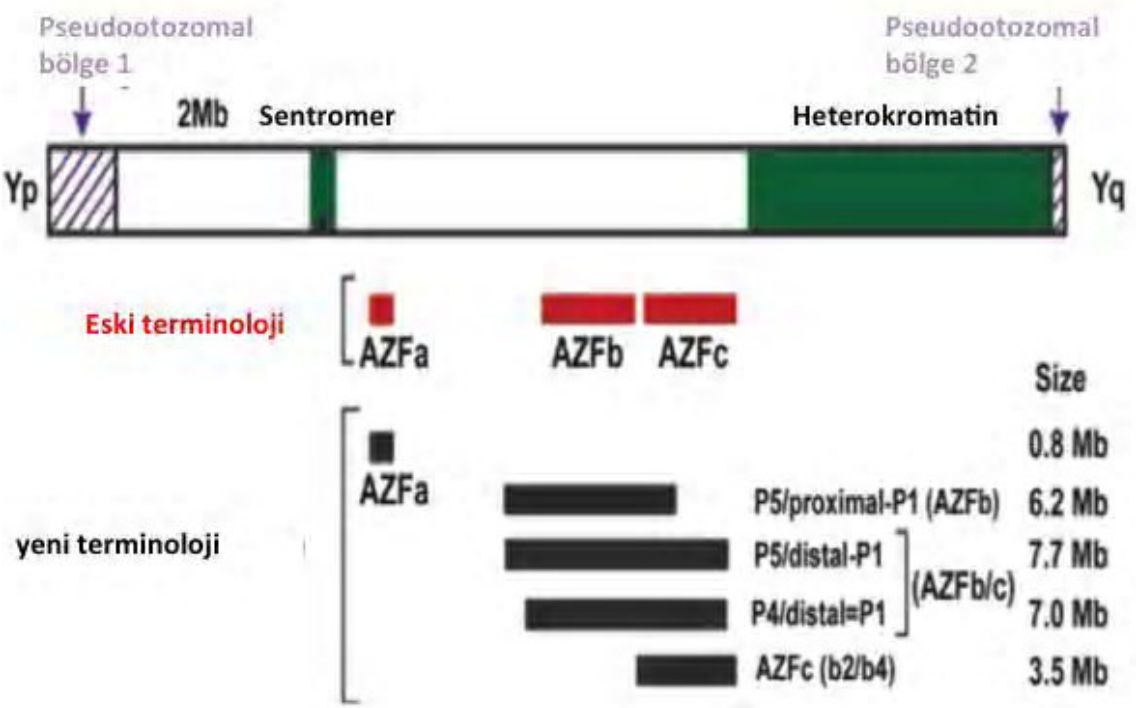
2.1.1.3.2.Y-Kromozom İnfertilitesi(Y Kromozomunun Mikrodelesyonu)

Erkek infertilitesi ile ilişkili en önemli patogenetik kusurlarından biri Y kromozomu (Yq) uzun kolunun mikrodelesyonlarıdır. Y-kromozomu infertilitesi olan erkeklerde hiçbir belirti yoktur, ancak fiziksel muayenede küçük testisler ve/veya kriptorşidizm ve varikosel ortaya çıkabilmektedir (43). Azoospermik erkeklerin %13'ü, şiddetli oligozoospermi erkeklerin %1 ila %7'si, şiddetli primer testis yetmezliği ve 5 milyon/ml'den daha az sperm yoğunluğu olan erkeklerin %5'i Y kromozomu mikrodelesyonu taşımaktadır (41). Yq11'de ―Azoospermi Faktörü (AZF) lokusunu da içeren ve delete olan bölge yer almaktadır. Bu bölge AZFa, AZFb AZFc ve AZFd olarak adlandırılan dört tane birbiri ile örtüşmeyen alt bölgeye ayrılmaktadır (31,44).

Bireysel mikrodelesyonların nispi frekansı AZFc, AZFa ve AZFb bölgeleri için sırayla %60, %5 ve %16'dır. Ancak kombine delesyonlar, vakaların yaklaşık %15'inde meydana gelmektedir (45). Delesyonlar büyük palindromik tekrarlar arasında meydana gelme eğiliminde oldukları için, Repping ve arkadaşları tekrarlayan delesyonlar için yan tekrarların adını kullanarak daha uygun bir isimlendirme önermişlerdir (şekil 2.4) (43,46). Bu bölgelerin her biri özel bir testiküler histoloji ile ilişkili olabilir ve infertiliteyle ilişkili olabilecek çok sayıda aday gen bu bölgeler içinde bulunmaktadır. Deleted in Azoospermia (DAZ) gen ailesi, delesyonu en sık görülen AZF aday geni olarak tanımlanmış olup AZFc bölgesinde lokalize olmaktadır (46).

Yq de novo delesyonları erkeklerde en sık meydana gelen kromozomal anormalilerden birisidir. Mayoz veya erken pre-implantasyon gelişimi sırasında, yüksek sıklıkta tekrarlayan DNA dizilerinin arasındaki rekombinasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (31,47).

Spermatogenik başarısızlığın değişik derecelerini taşıyan infertil erkekler üzerinde son zamanlarda yapılan çalışmalarda, "gr/gr" delesyonu ve Y kromozom 1.6-Mb delesyonu spesifik olarak henüz tanımlanmıştır. Y-kromozomu infertilitesi Y-bağlantılı bir şekilde kalıtılmaktadır (47). Delesyonlar genellikle de novodur ve bu nedenle probandın babasında mevcut değildir. Nadiren, bir aile içinde Y kromozomunun aynı delesyonu bazı erkeklerde (diğerlerinde değil) de kısırlığa neden olabilmektedir. Bu nedenle AZF bölgesinde delesyonu olan bazı infertil erkeklerin infertil oğulları olabilmektedir (48). AZF bölgelerinin delesyonu nedeniyle infertil olan erkeklerin örneklerinden, intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) yöntemi kullanılarak gerçekleşen gebeliklerde erkek çocukların da babalarıyla benzer delesyon taşıdıkları gösterilmiştir (43).



Şekil 2.4. Y kromozomunun fertilite ve infertilite ile ilişkili olan bölgeleri (43)

2.1.1.4.Azoospermi

Azoospermi, semen örneğinde hem spermatozoa, hem de spermatogenik hücrelerin bulunmaması durumudur. Bu durum genellikle gonadların sekresyon bozukluklarına eşlik eden, seminal kanalların tam obtrüksiyonu nedeniyle ortaya çıkabilmektedir. Spermin seminal sıvıda bulunmaması nedeniyle bu durum erkek infertilitesi ile sonuçlanır. Genel popülasyonda azoospermi vakalarının prevalansı %2 olarak tahmin edilmiştir. Aynı zamanda %10-20 kadar yüksek olduğunu gösteren araştırmalar

mevcuttur. Testiküler histoloji, tübüler hasardan hip ospermatogeneze kadar değişen, spermatogenik bozuklukların farklı derecelerini göstermektedir (22,48).

2.1.1.4.1. Pre-Testiküler Azoospermi

Tüm azoospermili erkeklerin %2'sini içermektedir; hipotalamik veya hipofiz anormallikleri nedeniyle hipogonadotropik-hipogonadizm şeklinde tanımlanmaktadır (49).

2.1.1.4.2. Post-Testiküler Tıkanıklık veya Obstrüktif Azoospermi (OA)

Tüm azoospermili erkeklerin %60'ını oluşturmaktadır. Bu durumda spermatogenez normaldir ancak obstrüktif azoospermi veya retrograd ejakülasyon görünmektedir (36,50).

2.1.1.4.3. Obstrüktif Olmayan Azoospermi (NOA)

Azoospermi prevalansı infertil erkeklerin yaklaşık %10 ila %15'ini ve toplam erkek nüfusunun yaklaşık olarak %1'ini ve tüm azoospermili erkeklerin %40'ını oluşturmaktadır. NOA testiküler yetmezlikten kaynaklanmaktadır. Bu durum da testis, olgun spermatozoadan tamamen yoksundur (49). Testiküler yetmezlik etiyolojileri arasında seks kromozom anomalileri, translokasyonlar, Y kromozomu mikrodelesyonları, inmemiş testis, testis torsiyonu, radyasyon, toksinler ve varikosel gibi genetik bozukluklar ve çevresel faktörler yer almaktadır (49). Tüm erkek nüfusunun %5-20'sinde, tüm infertil erkek nüfusunun %20-40'ında ve NOA ile erkeklerin %5-10'unda rastlanan varikosel, testisleri çevreleyen damarların pampiniform pleksustaki genişlemesi olarak tanımlanmaktadır (51).

2.1.1.5. Konjenital bilateral vas defferens yokluğu (CBAVD)

(CBAVD) konjenital bi lateral vas defferens yokluğu CFTR mutasyonu ile ilişkili ve yüzde 2 oranında OA erkeklerde görülür. Fakat obstrüktif azoospermi çeşitlerinin insidansı devletler arasın da değişmektedir. Vaz defferens yokluğunun hastane tanısında hata yapmamak için, bütün azoospermik erkeklerde (CBAVD almamak içindir) özenli bir fizik takip, semen hacmi 1.5 ml'den az olmamalı ve ph'nın 7'nin altında olmadığına bakılması gerekir. Konjenital bilateral vas defferens yokluğunun poliklinik sonuçları vazdeferenslerinolmaması, seminal keselerin hippoplazisi, epi didimal bozukluklar da mevcuttur, düşük semen hacmi ve asitli pH spermatogeneze tesir etmemiştir (52).

2.1.1.6. Oligospermi

Erkeklerde olağan olarak kabul gören sperm sayısı ortalaması 20 milyon/ ml civarlarındadır. Bu değerin aşağısına düşen sperm sayısı, normal değerinin aşağısında olarak değerlendilir. Oligospermi 15 milyon / mL'den az sperm konsantrasyonu veya tercihen 39 milyonun altındaki toplam sayı (konsantrasyon X hacmi), oligospermik olarak sınıflandırılır (22,26,53).

2.1.1.7. Astenospermi

Sperm sayısının normal olmasına karşın sperm hareketinin veya hareketli sperm sayısının normalden az olmasıdır. Astenospermi, hızlı ilerleyici motilite ile % 40'dan az sperm motilitesi veya % 32'den az olarak tanımlanır. Spermlerin kauçuk (özellikle kondom), spermisidler aşırı sıcaklık veya toplama ile muayene arasındaki uzun gecikmelere maruz kalması sonucu ortaya çıkan sahte astenospermi dışarıda bırakılmalıdır. Düşük sperm motilitesi, oligosperminin sıkça eşlik eder ve genellikle morfolojik defektlerin karışık bir resmini bozuk spermiyogenezi düşündürür. Spermlerin spesifik ultrastrüktürel defektleri elektron mikroskopisi ile sıfır sperm motilitesi veya aşırı astenospermi olduğunda (% 5'den düşük motil sperm olduğunda) değerlendirilebilir (29,50).

Standart meni analizleri genellikle normal sperm konsantrasyonlarını ve morfolojisini gösterir ancak kuyruk anormallikleri gösterilmez. Kısa, düz veya kalın kuyruklar veya orta parça kusurları. Yaşam testleri, bu hasta grubunu nekrospermi spermde yapısal kusurları olan hastalar ICSI tarafından tedavi edilebilir (29,50).

Astenospermi ayrıca sperm otoimmünitesiyle ilişkili olabilir. Orta derece diğer motilite kusurlarının nedenler bilinmiyor. Mutlak asthenospermia (yalnızca immotil spermatozoa'nın alınabileceği durum), 5000 erkekte 1'lik bir sıklıkta bildirilir ve çok düşük fertilite prognozu anlamına gelir (22,28,50,53).

Son yapılan bir olgu sunumunda, teofilin, retrograd boşalma ve total sperm astenospermisi olan bir hastada immotil spermatozoa'yı uyarmak için etkili bir ajan olduğu gösterilmiş ve sağlıklı bir canlı doğum bildirilmiştir. Sperm kuyruk esneklik testi (STFT), hipo-ozmotik şişme testi (HOS) ve lazer atış sistemi gibi diğer sperm seçim yöntemlerinin yararlı olduğu rapor edilmiştir (22,26,53)

2.1.1.8.Nekrospermi

Nekrospermi, diğer şiddetli astenospermi tiplerinden ayırt etmek önemlidir, çünkü nekrospermi olan bazı hastalar, düşük sperm hareketliliğine rağmen gebelik üretirler Nekrosperminin genel olarak % 20-% 30'undan az sperm motilitesi, daha azında % 5'ten fazla progresif motilite ve canlılık testinde % 30-40 arasında bir ölü sperm oranının olduğunu göstermektedir. Sperm otoimmünitesi ve toplama problemleri gibi ciddi astenosperminin diğer nedenleri hariç tutulmalıdır. Nekrosperminin şiddeti, özellikle koital frekans değişiklikleri ile dalgalanabilir. Nekrosperminin karakteristiği, boşalma sıklığının artmasıyla sperm hareketliliğinin ilerlemesidir. Bu durum, epididimidlerin kuyruklarında spermlerin depolanmasında veya genital bölgede stazın hatalı depolanmasından kaynaklanabilir ve aynı zamanda, kronik omurilik yaralanması ve boşalma kanalları bölgesindeki kistlerle ilişkili, yetişkin polikistik böbrek hastalığında da ortaya çıkar. Ejeküle edilen spermde dejenerasyonun ultrastrüktürel özellikleri vardır, ancak testis biyopsilerinde geç spermatitlerin normal yapısı vardır. Antibiyotik tedavisi yararlı olabilir, ancak bu ispatlanmamıştır. Çift, ovülasyon zamanına kadar 3-4 gün boyunca bir veya iki kez her gün birleşmelidir (28,51,53).

2.1.1.9. Teratospermi

İnsan sperm hücresinin kendisine özgü iğ şeklini alan bir baş yapısı bulunmaktadır(19). Genel olarak, insan spermatozaları görünüş açısından çok değişken olup, sperm morfolojisinin mikroskobik değerlendirilmesi son derece subjektiftir ve laboratuvarlar arasında standardize edilmesi zordur. Fertil erkeklerden elde edilen hareketli spermlerin yalnızca küçük bir kısmı (<% 25), ZP'yi in vitro bağlayabilir ve bu zona bağlama kapasitesi, sperm kafasının morfolojisi ile yakından ilişkilidir (23,28,51,53).

Kimi zaman sperm başı değişik şekillerde olabilir. Bütün normal sperm analizlerinde birtakım hücrelerin normal olmayan şekilli, şeklinde yazılmıştır ve mutlak bir yüzde ile ifadesi yapılır. Şayet, normal olmayan şekilli sperm hücrelerinin oranı yaklaşık olarak % 100'e yakın ise teratospermiden bahsedilmektedir. Bu kimi zaman hastalarda endişelere neden olmaktadır. Bu spermlerle tüpbebek yapılır ise ve gebelik olursa bebeğin anormal olmasından korkulmaktadır. Bu tip spermler normal yollarla dişinin yumurtalarını dölleyemezler; fakat, tüp bebek uygulamalarında kullanılabilirler (28,51).

2.1.1.5. Mitokondri DNA mutasyonları

Sperm hareketliliği üzerinde önemli bir etkiye sahip olan ve solunum zincirinin birçok temel bileşenlerini üretebilen mitokondri kendi genomunu (çekirdek dışı genom) taşımaktadır. Sperm üretiminin kalitesi ve miktarı hem çevresel, hem de genetik faktörler tarafından büyük ölçüde etkilenebilmektedir. Sperm mitokondrisi, spermatozoa evresinde bu hücrelerin yüksek adenozin trifosfat (ATP) talep etmeleri nedeniyle önemli bir rol oynamaktadır. Spermin çıplak mitokondriyal DNA'sı (mtDNA) üzerine reaktif oksijen türleri ya da serbest radikaller tarafından yapılan rastgele saldırılar kaçınılmaz olarak patolojik sonuçlara yol açmaktadır. Bu durum mitokondriyal genomunun oksidatif hasarına veya mutasyonuna neden olabilmektedir ve erkeklerde kısırlığa yol açabilmektedir. (52).

2.1.1.6. Monogenik Bozukluklar

Monogenik genetik bozukluklar, defekt taşıyan tek bir genin doğrudan mutasyonu sonucu meydana gelmektedir. Bu bozukluklar Mendel kanunlarına göre basit bir model ile aktarılmaktadırlar. Erkek infertilitesi ile ilişkili birincil genetik defekt olarak tanımlanan 50'nin üzerinde monogenik bozukluk vardır. Kromozom 3'ün kısa kolunda (3p24) bulunan ve DAZ geni otozomal homoloğu olan DAZL (DAZ-like) geninde gerçekleşen bir otozomal anomalinin spermatogenik kusurdan sorumlu olabilmesi mümkün olabilmektedir. Y kromozomunun uzun kolundaki AZF lokusunun genetik bozukluğu ise işaretli bölge sekanslarını saptayan tekniklerin gelişmesi ile ortaya konmuştur (31,52).

2.1.1.7. Multifaktöriyel Bozukluklar

Multifaktöriyel bozukluklar, genellikle çevresel nedenlerin eşlik ettiği birçok gendeki mutasyonlardan kaynaklanabilmektedir. Örneğin, metilentetrahidrofolatredüktaz (MTHFR) geninde meydana gelen mutasyonun (C677T ve A1298C) farklı multifaktöriyel bozukluklara yatkınlığı arttırdığı gösterilmiştir. MTHFR enzimi, homosisteinin remetilasyon döngüsünde görev yapar. Eksilen MTHFR aktivitesi sonunda 5 MTHF seviyesi azalmakta ve 5-10 MTHF miktarı ile plazma homosistein seviyesi artmaktadır. MTHFR enziminin noksanlığında klinik belirtilerin engin bir yayılım gösterdiği anlaşımıştır (52,53).

2.2. METİLASYON

Metilenme, bir moleküler bileşiğe, metil grubunun(CH3) eklenmesiyle olur. Kimyevî bir tepkime olan bu işlem biyolojik sistemlerde de gerçekleşir. Sonuçta gen ifadesini, protein fonksiyonunu kontrol eder. Ağır metallerin değişikliğe uğramasında ve RNA metabolizmasında görev alır. Metilenme protein ve DNA metilasyonu olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşir (54).

2.2.1.Protein Metilasyonu

Protein metilenmesi proteini oluşturan aminoasitlerden lizin ve arjinin aminoasitlerine metil grubu eklenmesiyle oluşur. Arjinini metilleyen enzim peptidil arjinin metiltransferaz diye adlandırılmaktadır. Bu enzim arjinini bir veya iki kez metilleyebilir. Dimetillenme aminoasitin ya iki metil grubunun aynı azot atomuna (asimetrik dimetil) ya da ayrı ayrı azot atomlarına birer metil gruplarının (simetrik dimetil) eklenmesi şeklinde gerçekleşir. Lizin aminoasitine metil ekleyen enzim de lizinmetiltransferaz olarak adlandırılır. Lizini üç sefere değin metillenebilmektedir (hipermetilasyon). Protein metilenmesi daha fazla histon proteinleri için çalışılan bir sistemdir ve genelde histon metilasyonu şeklinde adlandırılırlar. S -Adenozil metiyoninden metil grupları histon metiltransferazlar (HDAC) aracılığıyla histonlara aktarılır (55,56).

Burda histon proteinlerine 1, 2 ya da 3 adet metil grubu (mono,di, tri metilasyon) eklenerek metillenirler. Genin ifade edilip edilmeyeceğini o geni açık veya kapalı konuma (switch-on/switch-off) getiren olay; bu ve bunun gibi modifikasyonlardır. Açık/ kapalı gen dizileri bulunduğu hücre şekline göre farklılık gösterebilir. Histon-3 kuyruğundaki metilastonunun epigenetik regelasyonda mühim bir işlevi vardır. Histon3 lizin-4 (H3K4) tri_metilasyonu ökaryotlarda promotör bölgelerini belirler. Sonuç olarakta, histonların metillenmesi gen ifadesini açık veya kapalı konuma getirerek gen ürününün oluşup oluşmadığınını kontrol eder(55,56).

2.2.2. DNA Metilasyonu

DNA metilenmesi omurgalılara özgün şekilde CpG (C-sitozin, P-fosfat, G-Guanin) bölgelerinde DNA metiltransferaz enzimiyle metil grubunun bağlanması sonucunda gerçekleşmektedir. Metil grubu DNA'ya sitozin(C) bazının pirimidin halkasındaki 5 numaralı karbon atomuna eklenir. Sonuç da 5-metil-sitozin oluşur. Burada metil vericisi olarak yine S-Adenozil-Metiyonin(SAM) görev alır. Omurgalı genomunda CpG-

bölgeleri dediğimiz bölgeler bilhassa gen promotör bölgelerinde, yani genin başlangıç kısmında normalden daha çok bulunmaktadır. Yani; genin başlangıcı CpG adaları ile işaretlenmiştir. Buraya bağlanacak moleküller için tanışma bölgesi oluşturur(57,58).

2.2.3. Metilasyon Mekanizmasında Görev Alan Moleküller Metiltransferazlar

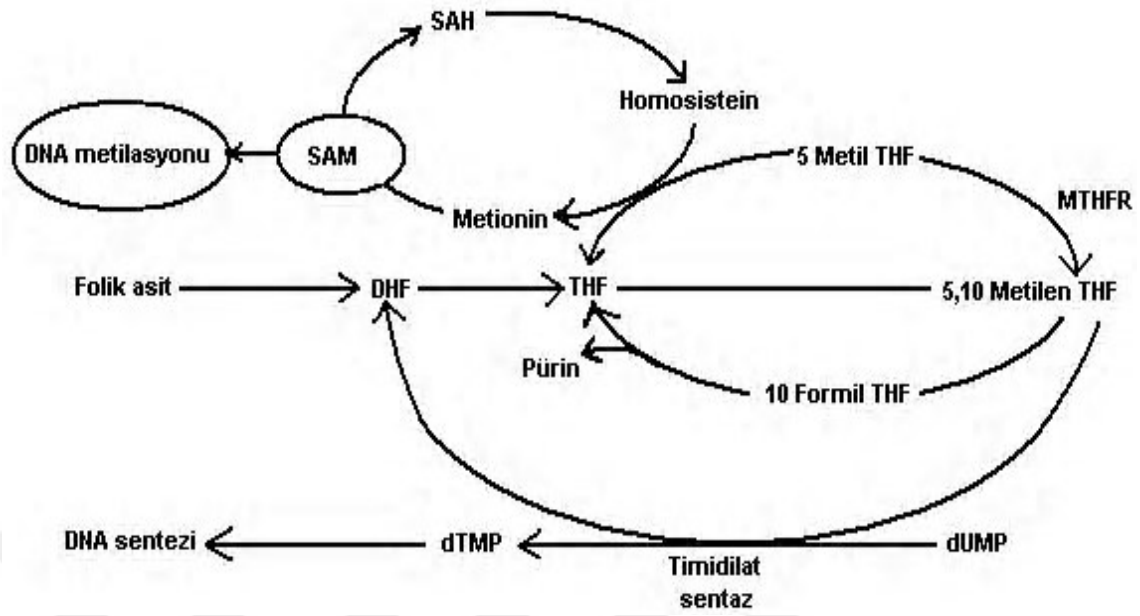
DNA'nın CpG adalarına metil-grubu ekleyen enzim DNA-metiltransferaz (DNMT) olarak adlandırılmaktadır. Memelilerde, DNMT-1, DNMT-3A ve DNMT-3B olarak ifade edilen 3 tane DNA-metil-transferaz vardır. Peptidil arjininmetil transferaz ve lizin metil transferaz enzimleride proteinlere metil grubu ekleyen enzimlerdir. İsimlerinden de anlaşıldığı gibi, peptidil arjinin metil transferaz arjinin aminoaisitine, lizin metil transferaz ise lizin aminoaisitine metil grubu ekler(59).

2.2.3.1. S-Adenozil Metiyonin (SAM)

S-Adenozil metiyonin (SAM) metil vericisi olarak görev alan SAM, homosistein metabolizmasıdaki birinci başmağı oluşturancak moleküldür. SAM, esansiyel aminoasit olan metiyoninden oluşur ve S-Adenozil homosisteine (SAH) dönüştürülür (Şekil 2.5)(60,61). Bu ise homosistein ve adenozin olarak hidrolize edilir. Metiyonine bağlı olarak eksikliği veya fazlalığı bu yolağın trans sülfürasyon yolağına veya remetilasyon yolağına girmesine sebep olur. Metiyonin seviyesi yeterliyse, homosistein B6-vitaminine bağımlı bir enzim olan sistatyon-betasentaz (CBS) ve γ-sistatyoninazin katalize ettiği reaksiyonlar ile sisteine dönüştürüleceği trans sülfürasyon yolağına girer.

Metiyonini korumak gerekliyse, remetilasyon yolağına sokulur. Bu yolakta birinci olarak, vitamin-B12 bağımlı bir enzim olan metiyonin-sentaz (MS) homosisteinden bir metil grubunu 5-metil tetrahidrofolata aktararak, homosisteininin 5-metil tetrahidrofolata dönüşümünü gerçekleştirir(58,62).

İkinci basamakta ise; 5-metil tetrahidrofolat, vitamin-B2 kofaktörüyle metilen tetrahidrofolat-redüktaz (MTHFR) enzimi ile 5,10-metilentetrahidrofolata dönüştürülür. Diğer bir metilasyon yolağındaysa metil vericisi olarak beta-in kullanılır ve reaksiyonu beta-inhomosistein metiltransferaz (BHMT) enzimi katalize eder(37,60,63).



Şekil 2.5. DNA metilasyonu mekanizması (60)

2.2.4. Metilasyonun Fonksiyonları

Omurgalılarda, zigot oluşumunun hemen sonrasında sekiz hücreli döneminde, yani zigot totipotent kök hücre şeklinde bulunduğu ve her çeşit hücreye farklılaşabildiği dönemde canıllarının genomu metil bulundurmamaktadır. Metillenme bu basamaktan sonra başlayarak blastula evresinde biter. Bu basamaktğın sonrasında metilasyon dış faktörlerle de etkileşim yaparak genin regülâsyonunu etkiler. Sonuçta interlökinin sinyalini kontrol eder ve kanser oluşumunu da etkiler. Metilasyonun işlev gördüğü sistemden diğeriyse bakterinin konak savunmasıyla ilgilidir. Burda bakteri metilli ve metilsiz genomu kendisine ölçüt olarak belirleyip, genomun kendinemi yoksa elgin bir konağamı ait olduğunu belirlemede kullanır. Metilasyonun fazlaca bilinen fonksiyonlarından diğeri de DNA replikasyonu sonucunda oluşan yeni ve eski ipliklerin ayrılmasında görev almasıdır. Bu yeni iplikçiklerin metillenerek eski iplikçiklerden ayrılmasıdır. Metillenmiş olan DNA'lar pasiftir, metil grubunu çıkarıldıktan sonra aktif hale gelmektedirler. Evelden de söz ettiğimiz şekilde metillenme DNA'nın CpG adacıklarında meydana gelmekteydi(60). Bu olay sadece embriyonik kök hücrelerde böyle değildir. Embriyonik kök hücrelerde metillenme CpG adacıklarından farklı gerçekleşmektedir. X kromozomu inaktivasyonu gene metilasyon mekanizmasıyla açıklanmıştır. Metilasyon yalnızca gen bölgelerinde değil aynı zamanda gen içermeyen peri-sentromerik heterokromatin bölgelerinde de gözlenebilmektedir. Burdaki metilasyon görevi kromozom yapılanması ve bu yapının bozulmamasını sağlamak ile de

ilintilidir. Hareketli genetik elementlere karşı da savunma gösteren bir mekanizma olan metilasyon, imprint olan genlerin ekspresyonu için de önemli işleve sahiptir(58,59,60).

2.3. FOLAT METABOLİZMASI

Folat eksikliği nöral tüp defekti, kardiovasküler hastalıklar, infertilite ve anemi ile bağlatıldır. Folat eksikliğin kanser gelişimine dahil edilmesi son yılarda olmuştur. Folatın kanserden koruyabilmesinin mekanizması çok açık değildir, fakat bu etki DNA sentezi ve DNA metilasyonunda folatın rolüyle ilgili olabilir. Epidemiyolojik çalışmalar folat düzeyi ve kolorektal karsinomların sıklığı arasında ters bağlantı gösterir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarının sonuçları folat ilavesinin kanser riskini artırması veya azaltmasının dozaj ve zamanlamaya bağlı olabileceğini ileri sürmektedir (61,62,63,64).

Folatın etkisi alkol, methionine ve MTHFR polimorfizmleriyle hafifletilmiş gibi görünmektedir(62,78). Folat düzeyi bu genlerin polimorfizmleriyle potansiyel olarak alt üst edilebilir. Folat eksikliğinin malignansı etkilemesinde iki mekanizma bulunması muhtemeldir (63,65). Bir karbon transferi düşünüldüğünde, folat S-adenosil metiyonin (SAM)'ın sentezi için önemlidir. SAM DNA metilasyonunda önemli bir bileşiktir. DNA metilasyonu gen ekspresyonunda DNA stabilizasyonunda ve mutagenezisde epigenetik bir belirleyicidir(64,78). Folat eksikliği DNA hipometilasyonuna ve böylece proteonkogenlerin aktivasyonuna sebep olabilir (65,66,67,68)

Folat normal DNA sentezinde ve tamirinde önemlidir. Bu sebeple folat eksikliği DNA habercilerinde bir dengesizliğe DNA sentezi esnasında urasilin yanlış birleşmesini teşvik ederek, DNA tamir felaketi, DNA kırıklığı ve kromozom hasarına yol açar(82). DNA kırıkları, kolorektal kanserler dahil neredeyse tüm insan kanserlerinde karekteristiktir (67,69,70,). Folat, MTHFR dahil birkaç enzimin katalizlediği metabolik transformasyonlarda gereklidir (71).

2.3.1.Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Enziminin Yapısı ve Görevi

5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi (MTHFR) flavoproteindir ve MTHFR ailesinin (EC 1.5.2.20) bir üyesidir (61,71,72). Memelilerdeki MTHFR'nin yapısı ile ilgi ilk bilgiler, domuz karaciğer enziminin saflaştırılmasıyla elde edilmiştir (72,74,75). Bu enzim sitoplazmik bir proteindir ve iki alt birimden oluşan homodimer yapısındadır (72). İnsanlardaki araştırmalar sonucunda 2 izoformu daha bulunmuştur (61,74). Bu

izoform dokuya özgün bir yapıda olup, 70 kDa'luk küçük alt birimler sahip izoform karaciğerden, 77kDa'luk büyük alt birimlere sahip izoform ise diğer dokulardan saflaştırılarak bulunmuştur (61,74). Enzim, tripsin ile proteolize uğratıldığında, 77 kDa'luk altbirim 37 kDa ve 40 kDa'luk altbirimlere ayrılmaktadır (74,75). Ayrılma sonunda S-adenozil metiyonin (SAM) inhibisyonu ortadan kalkar; fakat enzimin katalitik aktivitesi aynıdır. Yapılan çalışmalarda katalitik bölgede bulunan 40 kDa'luk N uç bölgesinin substrat ve koenzim bağlanım bölgelerine sahip olduğu ve 37 kDa'luk C uç bölgesinin ise, S-adenozil-metiyonin bağlama bölgelerini bulundurduğu gösterilmiştir (18,74,75).

Memeli enzimi kendine nonkovalent şeklinde bağlanan FAD koenzimini bulundurur ve bu koenzim; NADPH'ın metilentetrahidrofolata transferini gerçekleştirir (74,75). MTHFR, folat metabolizmasındaki önemli enzimlerdendir. 656 aminoasitten oluşan MTHFR enzimi, homosisteinin remetilasyon döngüsünde de (transsülfürasyon, remetilasyon ve homosistein yollarını kullanarak metabolize olur) işlevi vardır(61). MTHFR; 5,10-metilen tetrahidrofolatı (5,10-metilen THF) geri dönüşümsüz olarak 5-metiltetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürür (16,62,72). 5-metil-THF; DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlamaktadır. Bunun için 5-metil-THF, metil grubu vererek homosisteinin dönüşümesinde görevlidir. 5,10- metilen-THF ise deoksi-üridilatın timidilata dönüşümesinde kullanılırken diğer yandan da pürin sentezi için 10-formil-THF'a okside olmaktadır (64). MTHFR geninde oluşan bir mutasyon (en yaygın olanı C677T polimorfizmi) enzimin aktivitesini azaltır (76). MTHFR aktivitesin azalması ile 5- metil-THF düzeyi azalmaktadır. 5,10-metilen-THF miktarı ile plazmadaki homosistein miktarı artmaktadır (62,64,76). MTHFR enziminin azlığı durumunda dispanser semptomların geniş bir dağılım gösterdiği belirlenmişltir (69,70). Hiper-homosisteinemia ve homo-sisteinürianın ortaya çıktığı ciddi MTHFR eksikliğinde hipotoni, strok, tromboz, periferal nöropati, gelişme geriliği gibi klinik özellikler görülür (69,70,72,73). MTHFR eksikliğinin hafif olduğu durumlara da toplum genelinde epeyce yoğun rastlanır, bu durum arterial hastalıkların oluşumunda da önemlidir (69,70,74,75,76,77).

2.3.2. Homosistein

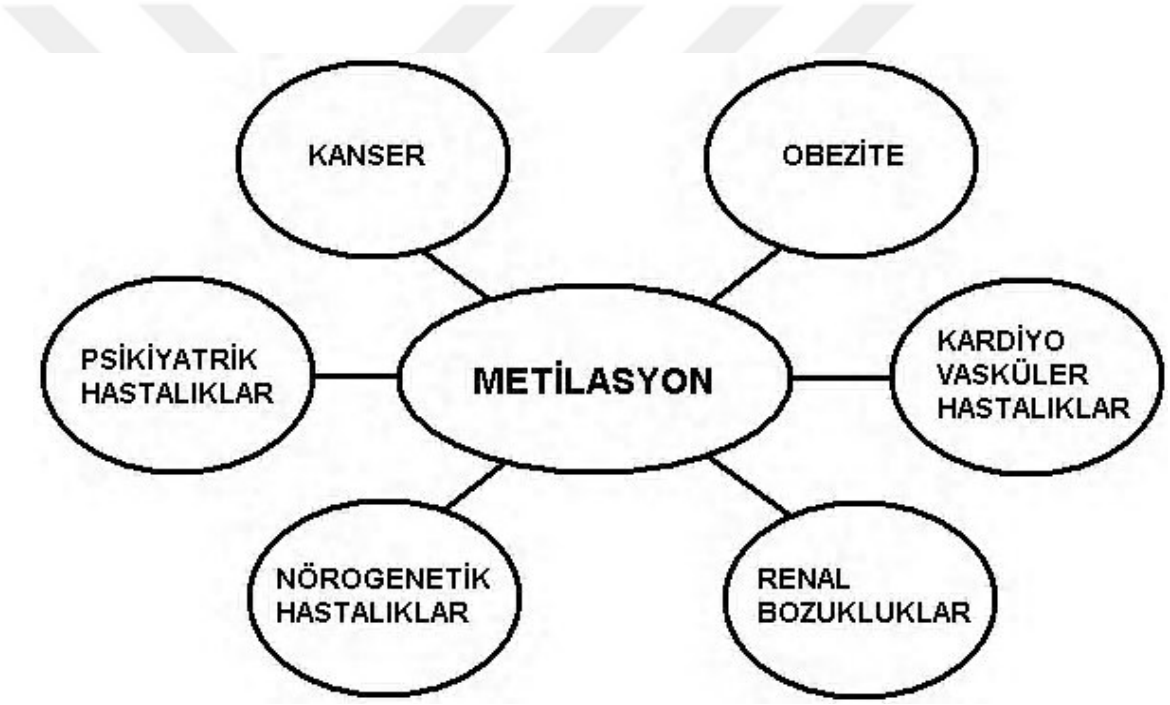
Homosistein, proteinlerin yapısına katılmayan bir amino asittir. Normal olarak diyetle alınmaz. Vücuttaki tek kaynağı esansiyel bir aminoasit olan metiyonindir. Homosistein adenosil metiyonın-bağımlı transmetilasyon reaksiyonlarında metiyoninden sentezlenir. Metiyoninin yeniden metilasyonu iki farklı enzim yoluyla meydana gelir. Dokuların çoğunda bu reaksiyon metiyonin sentaz tarafından katalizlenir ve kofaktör olarak kobalamine (vitamin B_{12}) substrat olarak metilentetrahidrofolat gerekir (78,79,80). Metilentetrahidrofolat, vitamin B_{12}'ye bağımlı enzim MTHFR'nın aracılığıyla yaygın folat havuzlarından gelir. Sonuçta sistatiyonin B-sentez (CBS)'in katalizlediği vitamin B6 bağımlı iki sıra reaksiyonda homosistein sisteine, glutatiyon'un habercisi olarak çevrilebilir (79,81,82,83,84)

Homosistein metabolizması bazı vitaminlerle yakından ilişkilidir ve homosistein metabolizmasındaki değişiklikler ateroskleroz, venöz tromboz, malignite ve nöral tüp defekti gibi patolojilerde önemli bir faktör olarak görülmektedir. Hücresel homosistein metabolizması, metiyoninin kullanılabilirliği, homosisteinin metiyonine remetilasyonu ve sisteine transsülfürosyonu ile regüle edilir (80,84,85,86). Plazma homosistein konsantrasyonları, genetik ve beslenme faktörleri tarafından regüle edilir. Plazma homosisteinindeki değişimler homosistein metabolizmasının yeniden metilasyonu yolları veya transsülfürasyondaki genetik veya çevre ilişkili hasarlardan sonuçlanabilir. Böylece, MTHFR plazma homosistein konsantrasyonunun düzenlenmesinde ve metiyonin havuzunun yeterli kalmasına da dahil edilir (85,87,88). Hiperhomosistenemia kardiovasküler hastalıklarla ilişkilidir. Görülen risk sınıflandırılır ve yayılan risk faktörlerinden bağımsız ve tüm kroner arter hastalığı ölümlerinin %10'undan fazlası bu fenotipe atfedilir (USA'da yılda 50.000'ın üzerinde). Hiperhomosistenemia ayrıca nöral tüp defektleri, inflamasyon bağırsak hastalıkları ve Alzheimer hastalığıyla da ilişkilidir (89,90,91,92).

2.4. Metilasyon Mekanizmasındaki Bozukluklar ve İlişkili Hastalıklar

Metilasyonla ilişkili genlerdeki mutasyonların oluşması veya metilasyon mekanizmasının bozulması sonucunda organizmanın işleyişindeki tanımlanabilen bazı bozukluklar vardır. Bunlardan biri olan metil transferaz DNMT3B genindeki mutasyon böyle bir bozulmaya neden olur ve sonuçta ICF (Immundeficiency Centromere, Facial anomalies) sendromu ortaya çıkar . ICF hastalarında uydu DNA'larda hipo

metilasyonun olduğu gözlenmiştir(47,56,58). Mental retardasyon ve otisitik davranışlar ile karakterize olan Rett sendromu, X kromozomu ile ilişkili bir hastalıktır . X kromozomunda bulunan MeCP2 genindeki mutasyon sonucunda olur. Bu genin ürünü CpG bölgelerine bağlanan bir proteindir ve bildiği gibi bu bölgeler aynı zamanda metil bağlanan bölgelerdir ve mutasyonu organizmada metilasyon sorununa sebep olmaktadır. Metilasyon sorunu sonucunda gerçekleştiği gösterilen diğer bazı hastalıklar Prader Willi Sendromu(PWS), Beckwith-Wiedemann sendromu(BWS) ve Angelman Sendromu (AS). Tüm bunlara ilave olarak metilasyon anomalileri kardiyovasküler hastalıklar, infertilite ve kanser ile de ilişkili bulunmuştur (24,25,30,33,54,91). Şekil(2.6)(91)



Şekil 2.6. Metilasyon ve ilişkili olduğu hastalıklar(91).

2.5. POLİMORFİZM

Doğal ortamda, aynı türden canlıların, çoğu zaman bazı görünümleri farklıdır. Bu farklılıklar genetik olarak belirlenmiştir ve polimorfizm diye adlandırılır. Popülâsyon genetikçileri, bir gen lokusu için, nadir alleller en az %1 frekansına sahip ve bu alleller için heterozigotlar en az %2 oranında görülürlerse polimorfık olarak tanımlarlar. Popülasyon genetiği açısından belli bir frekansa gereksinim olmasına karşın, moleküler biyoloji açısından, frekansın önemi olmayıp, bir ailede dahi görülen varyant, polimorfık

diye adlandırılmaktadır (78,87,93).

2.5.1 Genetik Polimorfizim Kavramı

Dünyadaki bir çok kişinin kromozomlarında aynı yerde olan DNA dizileri birbirleriyle benzerlik gösterir. Popülâsyondaki iki farklı kişi arasında DNA'nın takribî 1000 baz çifti uzunluğundaki herhangi bir kısmı olsa olsa bir baz(1bp) çifti değişimi içerir. Genin belli bir lokusta yer alan alternatif kopyalarından her birine allel adı verilir. Alleller, yaygın olduğu zaman genel popülâsyonda kromozomlarda % l'den daha fazla bulunur; bunlar da genetik polimorfizim diye adlandırılırlar. Tersine, zıt olarak alleller %1 den daha az sıklıkta ise, nadir değişimler (rare variants) diye adlandırılırlar. Genler ve intronlarda arasına yerleşmiş DNA dizilerinde de değişim gösteren bazı alleller bulunur. Bunlar, herhangi bir genin fonksiyonu için önemsizdir ve sadece direkt DNA analizleri ile belirlenir. Genlerin kodlanan dizi değişimleri farklı protein çeşitliliğine, bu durum da farklı fenotiplerin ortaya çıkmalarına sebep olur. Genetik hastalıklara sebep olan zararlı mutasyonların çoğu düşük değişimlerdir. Ağır genetik hastalığa neden olan mutant alleller genetik çeşitliliğin bir sonucudur. Birçok proteinin, farklı popülasyonlarda nispeten yaygın ve ayrılabilen şekillerde olduğu tespit edilmiştir (78,94).

Bu tip polimorfizimler, DNA dizilerindeki farklılıkların bir sonucu olmasına rağmen, DNA dizilerinin incelenmesinden ziyade, alleller tarafından kodlanan proteinlerdeki çeşitlilik incelenerek de, bazı polimorfik lokuslar çalışılabilir (78,94,95).

DNA analizlerinden çok, değişik proteinler üzerindeki çalışmalar, daha fazla bilgi verici olmaktadır. DNA dizilerinin değişimlerinden daha çok polimorfik allellerin ürünü olan bu proteinler, farklı fenotiplerden sorumludur. Bu nedenle, çevre ile birey arasındaki ilişkiyi, genetik çeşitliliğin nasıl etkilediğini bize açıklayan bu değişik proteinlerdir. Regülatör bölgede polimorlik alleller, genlerin transkripsiyonel regülasyonunu etkileyerek fenotiplerin belirlenmesinde önemli rol oynayabilir (78,87).

Herhangi bir kişinin, tüm lokusların takriben %20'sinde allellerin yapısal olarak farklı polipeptidler için heterezigot olabildiği gösterilmiştir. Farklı etnik gruplardan kişiler kıyas edildiği zaman proteinlerin büyükçe bir kısmının belirlenebilen polimorfizmi gösterdiği saptanmıştır. Böylece kendi enzimlerinin yapılışını ve diğer gen ürünlerini içeren insan türleri içinde, önemli derecede biyokimyasal bireysellik (chemical individuality) vardır. Birçok biyokimyasal yoldaki ürün etkileşim halindedir(78,96,97).

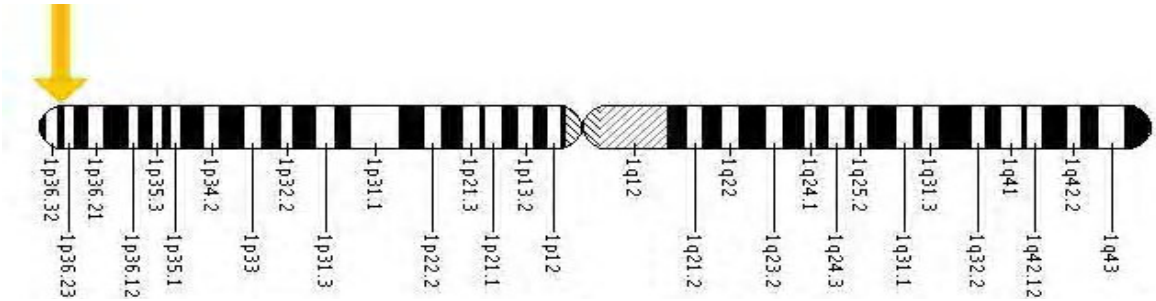
2.5.2. Tıbbı Genetikte Polimorfizimlerin Kullanımı

Polimorfizimler, tüm insan genetik araştırmalarında anahtar niteliğindeki elementlerdir. Polimorfizimler genin farklı kalıtsal formlarını veya genomun farklı bölgelerini ayırt edebilmek için kullanılmaktadır . Genetik göstergeler tıbbi genetikte kullanım için pratiklik sağlar. Bağlantı analiz yoluyla kromozomların beli bölgelerindeki genlerinin haritalanması, kroner kalp hastalığı, genetik hastalıklarda heterezigot taşıyıcıların belirlenmesi, genetik hastalıkta doğum öncesi tanısı, diyabet ve kanser gibi yaygın yetişkin hastalıklara yatkın kişilerin yüksek ve düşük risklerin değerlendirilmesi adli tıpta ve babalık testinde kullanım ve organ aktarımı için doku tiplenmesi tıbbı genetik kapsamına dahildir (20,79).

2.6. MTHFR

5,10MTHFR folat metabolizmasında önemli görev üstlenir. Folatın birincil forma sirkülâsyonun da geri dönüşsüz olarak 5-10-metilentetrahidrofolatı, 5- MTHF'a çevirir(1,13). 5- metil-THF de nova metiyonın sentezi için metil grubu sağlayarak indirekt olarak DNA metilasyonuna katılır. DNA sentezi için deoksi-üridülatın timidilata dönüşmesinde 5,10-metil-THF gereklidir (78,81,98).

Genler 5,10 MTHFR'yi şifreler(79). Gayette ve arkadaşları (1994) floresans in stü hibridizasyon yöntemiyle MTHFR geninin 1p36.3 de lokalizasyonunu belirlemişlerdir. Bu gen 150 kD'luk, 656 aminoasitten oluşan homodimerik bir protein şifreler. İnsan MTHFR geni 11 ekzondan oluşur (84,99).Şekil 2.7(84)



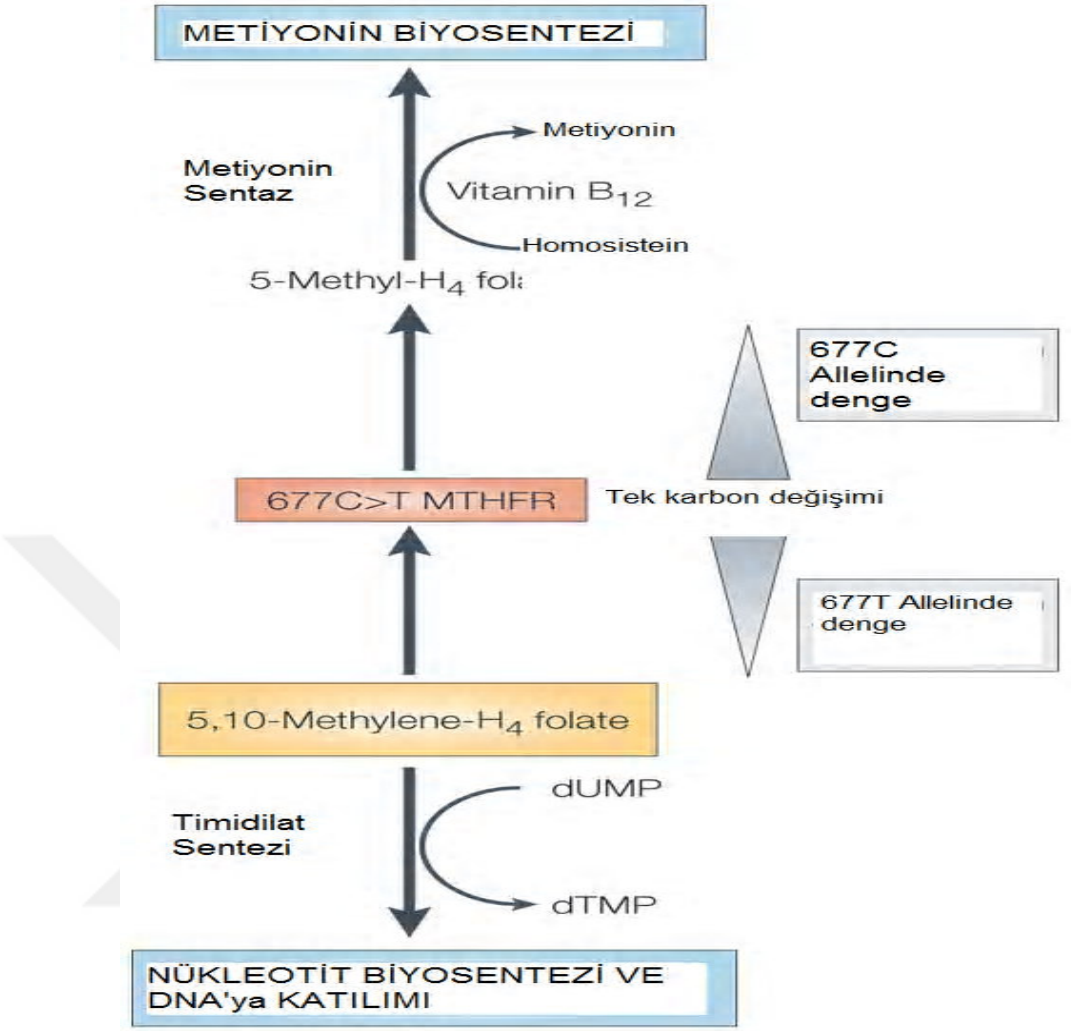
Şekil 2.7. MTHFR (Metilentetrahidrofolat redüktaz) geninin lokalizasyonu (84).

2.6.1. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Geninin Yapısı ve Özellikleri

MTHFR geninde görülen birtakım mutasyonlar, serebrovasküler ve kardiyovasküler hastalıkla için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olur (66,67,68,81). Yapılan cDNA çalışmalarıyla fare ve insan MTHFR geninin yapısı araştırılmıştır (69,70,84). Bu iki gen de 11 ekzon içermektedir. Ekzon uzunluğu ve ekzon intron sınırları benzeş karakter göstermektedir (62,67,83). Bu iki genin de kodlama sekansları, kodlanan aminoasitleri incelendiğinde % 85 özdeştir (62,67). İnsan MTHFR geni kromozom 1p36.3'de lokalizedir ve genin N-terminal ucunun yapısı tümüyle açıklanamamıştır (69,74,77,). MTHFR geninin promotör bölgesi, transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için belli konsensus dizilerine sahip iken TATA bulundurmaz. Bu gen bölgesinde alternatif (splicing) kaynaşma olayları meydana gelmekte ve bunun sonucundaysa değişik dokularda, farklı MTHFR transkriptleri(3 transkript) oluşmaktadır (74,77,86). İnsan genomik klonunun 2.2kb uzunluğundaki MTHFR cDNA dizisinin tümünü bulundurduğu belirlenmiştir. Bu MTHFR cDNA'sı, her biri 102 ila 432 bç uzunluğunda toplam 11 ekzon ile 250 bç-1,5 kb'a kadar olabilen intronlar içerir (69). Ekzon1, ATG başlama kodonunu taşır, 5' ve 3' kaynaşma bölgelerinde GT ve AG dinükleotidlerinden oluşan konsensus dizileri yer alır . Ekzon11'in 3'ucu, cDNA'da poliadenilasyon bölgesi ile biter(69). Poliadenilasyon sinyali (AACCTA), poliadenilasyon bölgesinin 15 bç önünde bulunur(69). Fare ve insan MTHFR geni üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda MTHFR geninde 15 farklı mutasyonu belirlenmiştir (69,82). Bu mutasyonlardan, nöral tüp defektleri kolon kanseri ve vasküler hastalık ile yakından ilişkili olduğu ifade edilen C677T polimorfizmi, enzimin katalitik bölgesinde, özellikle nöral tüp defektlerinde etkili A1298C polimorfizmi ise enzimin düzenleyici bölümünde görülmektedir(68,78,84).

2.6.2 MTHFR Polimorfizimleri

MTHFR eksikliği (yetersizliği) olan hastalarla yapılan ilk çalışmalarında, bazı hastalarda spesifik enzim aktivitesinin thermolabil olduğu belirlenmiştir. Kang ve ark. thermolabil MTHFR'lı bireyler ve kalp hastalığı olan kişiler arasında yaptıkları araştırmalarında thermolobil MTHFR'nin artmış insidansı olduğunu öne sürdüler. MTHFR geni klonlandıktan sonra, alanin _valin değişimiyle MTHFR'nin özellikli aktivitesinde % 50,% 60 azalmasıyla sonuçlanan 677 C→ T polimorfizmi gösterilebildi (24,30,85). Şekil 2.8.(85)



Şekil 2.8. MTHFR (Metilentetrahidrofolat redüktaz) 677C\T Polimorfizmi (85).

Bu allelik varyant için homozigot bireyler % 15'in üstündedir. 677C→T mutasyonu 5-metil-THF'in düzeyinin azalmasına, DNA sentezi ve timidilat için 5-10 metil-THF'ın seviyesinin artması ile sonuçlanır (85). Folat ve homosistein seviyelerinde 677 C→ T polimorfiziminin etkilerinin folat alımıyla değiştirebileceği bilinmektedir (79,85). MTHFR ve DNA metilasyonu incelendiğinde bir çalışmada (677'deki) TT varyantlı bireylerin DNA'sı ile (1298) CC varyantlı bireylerin DNA'sı ile kıyaslandığında önemli derecede yüksek metil grup kapasitesine sahip oldukları bulunmuştur, fakat bu çalışma geniş çalışmalarla desteklenmemiştir(85). 677 C → T polimorfizimi kolon kanseri ve lösemi için koruyucu olabileceği bildirilmiştir. İlk çalışmalar T allelinin lenfatik lösemi için koruyucu olabileceği fakat myeloid lösemi için olmadığını ileri sürmektedir (85,100).

Genel popülasyonlarda MTHFR'nın thermolabilitesinin bulunmasıyla 677 C→T değişimiyle ilişkilendirilmiştir ve bu polimorfizm ile bazı hastalık tipleri arasındaki ilgileşim araştırılmıştır(85). Çalışılan hastalık tipleri; alzheimer's hastalığı, nöral tüp defekti, kolon kanseri, kardiovasküler hastalıklar, lösemi, down sendromu, şeker hastalığı, infertilite ve gebelik komplikasyonları da dâhil edilmiştir(85). Kalp hastalığında 677 C→ T'nin etkisini gösteren erken çalışmaları yorumlamak zordur. Çünkü bu polimofizm yükselmiş homosistein düzeyleriyle her zaman ilişkili değildi. Son çalışmalarda polimorfizim sadece düşük folat alan hastalardaki yükselmiş homosistein seviyesiyle ilişkili olduğu açıklanmıştır. Böylece bu polimorfizimin etkisinin bireyin beslenme düzeyine bağlanması mümkündür(85).

MTHFR'nin en yaygın ikinci polimorfizmi nükleotid 1298'deki A→ C sübstitisyonunun içerir (78). Bu substitisyon MTHFR proteininde C terminal kontrol bölgesinde glutamatın alanine değişimidir. MTHFR aktivitesinde yaklaşık %35 azalmayla ilişkilendirilmiştir fakat thermolabil değildir ve plazma folatıyla bağlantısı gözlenmemiştir (78,86,101). Ayrıca son bir çalışmada, bu polimorfizm için homozigot olan bireylerde diyetteki total homosistein düzeyleri normal gösterilmiştir. MTHFR 677 TT genotipindeki bireylerin yanı sıra 1298 CC genotipli bireylerde de akut lemfatik löseminin riskinde azalma gözlemlenmiştir. İlaveten çift heterozigotlar (677 CT/1298 AC) normal bireylerle (TT) kıyaslandığında gelişen ALL riskinde önemsiz bir azalma gösterilmiştir(83). Buna zıt olarak, Song ve ark, yaptığı vaka kontrollü bir çalışmada 1298 CC genotip 1298 AA genotipiyle kıyaslandığında özofagus yassı hücre karsinomasının yükselen riskiyle bağlantılı bulunmuştur. Bu ilişki şu şekilde açıklanabilir; MTHFR metil vericisi yapısı ve de nova nükleotid sentez aracılığıyla folat metabolizmasında merkezi bir rol oynamaktadır Bu metabolik yolun DNA sentez, tamir ve DNA metilasyonunun normal kalmasında kritik rol oynadığına inanılır. Düşük folat alımı durumunda hem bozulan DNA metilasyonu hem de DNA sentez/tamiri varyant MTHFR genotipe sahip olanlarda korsinogenezisin birincil mekanizması olabilir (83). Polimorfik MTHFR lokusu endometrial, kanser, servikal intraepitelyal neoplasi (5-26) ve meme ve/veya ovaryum kanseriyle de ilişkilidir. Folat ve kobalamin metabolizmasındaki tüm genler birbirleriyle ilişkili olduğundan, Folat veya kobalamin yolundaki bir gendeki polimorfizmin varlığı ya da yokluğu kanser veya kalp hastalığı gibi yaygın multifaktöriyel hastalıklar için tek başına açıklanamaz(83).

2.6.2. MTHFR Eksikliği

MTHFR metilentetrahıdrofolatın timidilat sentez için tek karbon vericisi, metiltetrahidrofolata, homosisteinin metiyonine yeniden metilasyonu için metil vericisi, redüksiyonunu katalizler. MTHFR tarafından katalizlenen bu reaksiyon tersinmez olduğundan, folatlara hem pürin hem de primidın metabolizmasında ihtiyaç hissedilir, sadece kobalamin-bağımlı metiyonin sentez reaksiyonu aracılığıyla fonksiyonel olarak azalmış folat havuzuna dönebilir(83,85).

Ciddi MTHFR eksikliği 85'den fazla yayınlanan vakada folat metabolizmasının en yaygın doğum hatasıdır. Major laboratuar bulguları hiperhomosistenemia ve hipomethioninemia'dır. Çünkü timidilat sentez ve MTHFR'nin substratı metilentetrahidrofolatın eksikliği yoktur. Ciddi MTHFR eksikliği olan hastalar megaloblastik anemiye sahip değildir. Bu cbl E ve cbl G'lı hastaların ondan ayrılmasına yardım eder. Neonatal periyottan erişkinliğe herhangi bir yaşta klinikle ilgili bulgular olabilir, hastaların çoğu bebeklikte tanımlanmasına rağmen öncelikli bulgular nörolojikti. Apne, gelişme geriliği ve senzures yaygın olandır ve muhtemelen beyindeki metiyoninin düşük seviyesiyle ilişkilidir (85). Diğer yaygın özellik thrombosisdir. Muhtemelen homosisteinin artan seviyesi aracılığıyla meydana gelir. Bazı yetişkinler tamamen semptomsuzdur ve sadece probandın teşhisinden sonra bir ailede tanımlanır. Gen kromozom 1p36.3'de klonlanmıştır ve bu zamana kadar 32 hastada 23 mutasyon bulunmuştur. Ciddi MTHFR eksikliğinde tedavi oldukça zordur ve betaine en yararlı terapi olmuştur(85).

2.6.3. MTHFR Popülasyon Sıklıkları

C677T varyantının sıklığının coğrafi ve etnik değişimi epeyce fazladır. TT oranı Amerika'daki siyah popülâsyonda, sahra Afrikasının uç kısımlarında ve Güney Amerika'da %1 iken US Hispaniks, Kolombiya ve Brezilya'daki Amerikalılarda %20'nin üzerindedir. TT genotip sıklığı Avrupa'daki beyaz insan toplumunda, Kuzey Amerika'da ve Avusturalya'da %8-20'dir. Avrupa'da, kuzeyden güneye doğru varyant sıklığı artmaya meyillidir . Japonların %12'si TT homozigottur (79). A1298C için, Kuzey Amerika çalışmalarında CC prevalansı, temelde beyaz tenli bireylerin dahil edildiği, %7-12 arasındadır. 4 Hispanik seride (n→ 90), sıklık %4- 5'tir. Amerika Afrika serisinde CC'li bireyler %24'tür (79,102).

Avrupa'daki çalışmaların çoğunda CC dağılım sıklığı %4-12 arasındadır. Çin, Japon ve Havai toplumlarında CC genotipli bireyler %1-4 arasındadır. Morocco, Brezilya, Türkiye, Güney Afrika ve İsrail Yahudilerindeki tek bir çalışmada sıklık sırasıyla %3 ,%6 ,%6 ,%4 ve %13'tür. Bazı serilerde çok az kişide üç veya dört varyant allel (örneğin; 677TT/1298AC, CT/CC, TT/CC) bildirilmiştir (79).

2.6.4. MTHFR A1298C ve C677T Mutasyonlarının Kombinasyonu

C677T ve A1298C mutasyonunun sıklığı popülâsyonlara göre ve yaşa göre önemli farklar göstermektedir (93). C677T ve A1298C mutasyonlarının ikisininde heterozigot olduğu durumda, MTHFR enzim aktivitesi, her iki allelin normal homozigot olduğu durumdaki enzim aktivitesinin %50-60'ı kadardır (93). Bu aktivite, C677T mutasyonunun heterozigot bireylerinin enzim aktivitesinden daha düşüktür (93). MTHFR 1298C-677T heterezigotlarını ikisininde bulunduğu bireylerde, nöral tüp defektlerinde yüksek artış olduğu öne sürülmüştür (93,94,95). Buna karşılık 1298AA-677CC homozigot normal bireylerde akut lenfoblastik lösemi (ALL) gelişimi çoken, 1298AC-677CT heterozigot bireylerde, akut lösemi gelişiminin daha az görüldüğü belirtilmiştir. 1298CC-677CC genotipine sahip bireylerde 1298AA- 677CC genotipli bireylere göre plazmadaki toplam homosisteininde azalma olduğu kaydedilmiştir. Tek başına C677T homozigot mutasyonlu (TT) genotipine sahip bireylerde de plazma homosisteini küçümsenmeyecek oranda artmaktadır (96,97). Vander Put ve ark. yaptıkları bir çalışmada, her iki mutasyon içinde çift heterozigot olan (C677T /A1298C) bireylerde toplam plazma homosistein konsantrasyonunun önemli derecede arttığını bildirmişlerdir (96,98). A1298C mutasyonu, MTHFR enziminin C-uç düzenleyici bölgesinde meydana gelmesine karşılık, C677T mutasyonu genin N-uç katalitik bölgesinde meydana gelmekte ve bu nedenle A1298C mutasyonlu bireylerde MTHFR enzim aktivitesindeki azalma C677T mutasyonlu bireylerin enzim aktivitesinden daha az olmaktadır (93,96,97,98). Daha önceki çalışmalarda da C677T mutasyonun MTHFR aktivitesinde önemli bir etkiye sahip olduğu açıklanmıştır . Hem heterozigot 677CT hem de homozigot mutant 677TT genotiplerinde, MTHFR enzim aktivitesi homozigot yabanıltip (677CC) genotipe göre önemli derecede düşüktür. 677TT genotipi, termolabile MTHFR enzim özelliğine sahiptir (99). 1298 A-C polimorfizminde azalan enzim aktivitelerine ramen ısı inkübasyonundan sonra 1298A-C genotipleri arasında artan aktivasyon yüzdesinde önemli bir farklılık görülmediği için, bu polimorfizmin

enzimin termostabilitesini etkilemediği bildirilmiştir (99). 1298A-C polimorfizminde MTHFR aktivitesinde önemli etkiler görülmesine rağmen ne 1298AC, ne de 1298CC genotipinde artan homosistein düzeylerine rastlanmamıştır (99). 1298AC-677CC ve 1298C-C677CC genotiplerinde MTHFR aktiviteleri, 677CC/1298AA genotip enzim aktivitesi ile karşılaştırıldığında sırası ile % 60-92 ve % 52-66 olarak bulunmuştur (99). Heterozigot (1298A-C677CT) genotip durumunda MTHFR aktivitesi ise 1298AA-677CC genotipi ile karşılaştırıldığında, % 36-62 olarak bulunmuştur (99,103).

2.6.5. MTHFR'nin Farklı Populasyonlarda Gözlemlenmesi

C677T varyantının sıklığı coğrafik ve etnik değişimlerde de çokça görülür. TT genotipinin sıklığı Amerika'daki siyah populasyonda, Sahara Afrika'sının alt kısımlarında ve Güney Amerika'da % 1 iken Amerika'da yaşayan Kolombiyalı, Latin İspanyollar ve Brezilyadaki Amerikalılarda % 20'ye kadar artmaktadır. Avrupa'daki beyaz populasyon, Avustralya ve Kuzey Amerika'daki TT genotipinin sıklığı % 8-20 arasında değişmektedir. Avrupa'da sıklık kuzeyden güneye doğru artmaktadır. Japonlarda TT populasyonu ise % 12 kadardır (83). 677 CT heterozigot polimorfizmi Afrikalılarda %13, Kuzey Amerika Kafkaslarında %44, İtalyanlarda %44 dağılım gösterir (74). Kuzey Amerika'da yapılan çalışmalarda A1298C polimorfizmi için CC genotipinin frekansı özellikle beyaz populasyon için % 7–12 dir. Amerika'daki İspanyol ve Latinlerde bu oran % 4 kadardır . Avrupa'da CC genotipinin sıklığı %12 ile %4 arasında değişkenlik gösterir. Japonya, Hawaii ve Çin populasyonunda bu sıklık %1-4'tür. İsrail, Morocco, Güney Afrika, Türkiye ve Brezilya'daki çalışmalarda sıklık sırasıyla %13, %3, %4, %6 ve %6'tür. Bazı durumlarda 3 veya 4 allel (677TT-1298AC;CT/CC, TT/CC) gözlenmiştir (20,30,34,71).

2.6.6. MTHFR Genotip Kombinasyonları

Genotiplerin kombinasyonlarının sıklıkların rapor edildiği çalışmaların çoğu küçüktür. İngiltere'deki 1.300'den fazla erkek üzerine yapılan geniş bir çalışmada %20'sinin MTHFR T alleli taşıdıkları rapor edilmiştir (71,83).

Biz de çalışmamızda Türk popülasyonunda folat metabolizmasının önemli enzimlerinden MTHFR enzimlerinin yaygın polimorfizmlerini (MTHFR 677 C→, MTHFR 1298 A→C) araştırdık. Çalışmamızda infertilite tanısı konulan 278 hasta ve 63 kontrol grubunun daha önce çalışılmış DNA örnekleri kullanılmıştır. PCR ve RFLP analiziyle sonuçlar değerlendirilmiştir (71,83).

2.7. Mutasyon Analizlerinde Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler

2.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

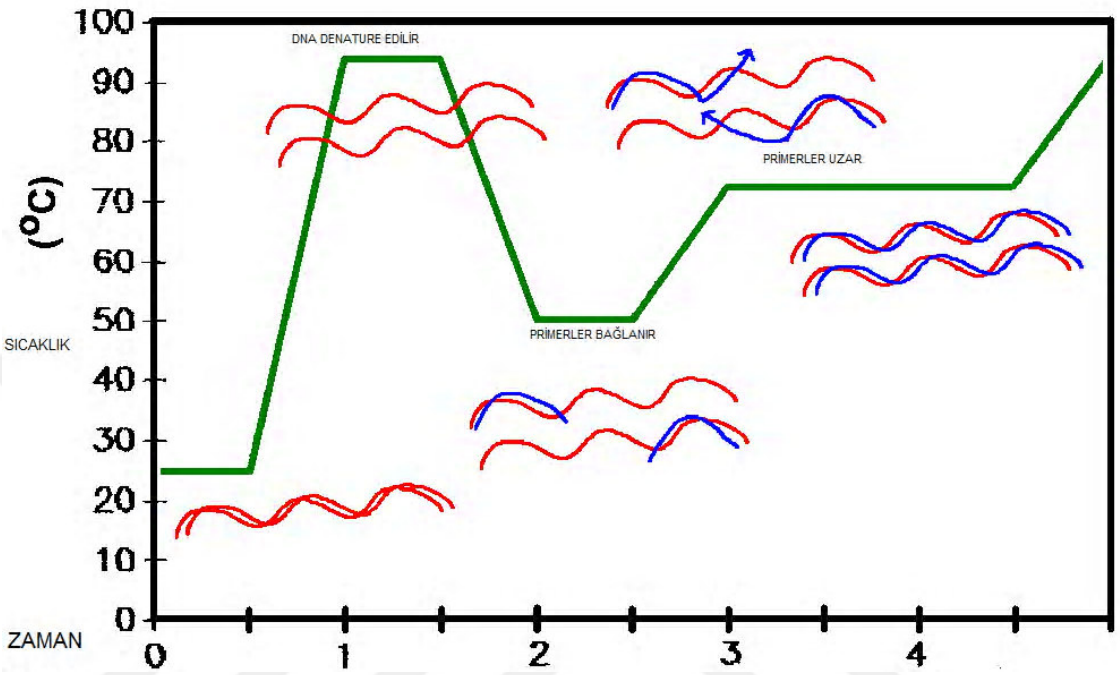
Polimeraz zincir reaksiyonu(PCR), özellikli bir DNA parçasının kopyalarının primerler ile yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde açıklanan *in vitro* bir yöntemdir (97,98,104). 1980'li yılların ortalarında Cetus firması araştırıcılarından Kary Mullis tarafından geliştirilmesinin ardından temel moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi ve DNA haritalanması gibi) ve birçok hastalığın (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, "Kırılgan X" sendromu, AIDS, lösemi vb.) DNA temeline dayalı tanısı için de klinik tıpta hızla kullanılmaya başlanmıştır (100,103,104). PCR ile istenilen genlerin ya da DNA dizilerinin, döngülere bağlı replikasyonu hızlandırılmış olarak gerçekleştirilir . Aynen doğal hücre bölünmesinde olduğu gibi, PCR replikasyon sürecini taklit ederek yaklaşık 30 döngü sonra seçilmiş bir DNA dizisinin yaklaşık milyar katı kopyalanır(99). Çoğaltma son derece başarılı olabildiğinden, bazen başlangıç kalıbının bir molekül kadar az miktarının bile PCR'da çoğaltılabileceği gösterilmiştir . Bundan dolayıdır ki bir veya daha fazla hedef molekül temin eden herhangi bir DNA kaynağı prensipte PCR için kalıp olarak kullanılabilmektedir. Kan, atasal biyolojik örnekler, sperm, eski adli örnekler gibi herhangi bir dokudan veya lâboratuar bakteriyel kolonilerden veya faj plaklarından hazırlanan DNA kalıp işlevi görebilir (102,104). Şekil 2.9.(105)



Şekil 2.9. (PCR) Polimeraz Zincir Reaksiyonu Cihazı (105)

Tek bir çift DNA primerinin her birinin takribî 18-30 bç uzunlukta ve benzer G+C oranına sahip olması gerekmektedir. Bu şekilde primerler benzer sıcaklıklarda tamamlayıcı dizilere tutunabilirler. Küçük oligonükleotitler için (<25bç) için bağlanma sıcaklığı, Tm= 2(A+T)+4(G+C) formülü kullanılarak hesaplanabilmektedir (102). Uzun primerler kalıp DNA ile daha yavaş eşleşirler ve bu da PCR etkinliğiniazaltır.30 nükleotitten daha uzun primerler çok ender kullanılmaktadır (103). PCR ile DNA sentezinde kullanılan enzim, kaplıca sularında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen yüksek sıcaklıklarda uzun süre kararlı olan *Taq* DNA polimerazdır . Bu enzimin sayesinde, in vitro DNA çoğaltılmasında otomasyona geçilebilmiş ve sürekli sentez reaksiyonlarıyla kısa zamanda çok miktarlarda elde edilmesi mümkün hâle gelmiştir(100,103). PCR, tek iplikli DNA'yı kalıp alan ve deoksiribonükleotitleri substrat olarak kullanan DNA polimeraz enzimi ile gerçekleştirilir. DNA polimeraz, bütün diğer polimerazlar gibi, 5' 3' yönünde sentez yapar ve senteze başlaması için mutlaka serbest 3'-OH grubuna gereksinim duyar . PCR'da kullanılan primerler, enzimin senteze başlaması için bir 3'- OH grubunu sağlar. Kısaca kalıp DNA, deoksiribonükleotitler, DNA polimeraz ve oligonükleotitlerin bulunduğu bir karışım, gerekli şartlarda, primerler kalıp DNA üzerinde kendilerine eş olan bölgelerle eşlenerek enzimin senteze başlaması için başlatıcı görev yaparlar. Daha sonra DNA polieraz, primerlerin ucuna serbest deoksiribonükleotitleri ekleyerek komplementer DNA ipliğini sentezler . Karışım, enzimin daha etkin çalışması için en uygun koşulları sağlamak amacıyla bir tampon çözelti de, genellikle 20-100 µl hacimde hazırlanır(95,106) Verimli bir PCR için primerlerin bağlanması, denaturasyon, döngü sayısı, primerlerin uzaması, PCR makinesinin sıcaklık iniş ve çıkışları son derece önem arzeder (99). PCR reaksiyonunun hazırlanmasının sonrasında, DNA sentezleme işlemine geçilir. PCR ile çift zincirli kalıp DNA'nın denatüre edilmesi, primerlerin kalıp DNA üzerinde kendilerine konplementer olan dizilerle eşleşmesi ve primerlerin uzatılarak yeni DNA ipliğinin sentezlenmesi işlemlerinden oluşur (Şekil 2.10.(106)). Her bir döngü sonunda DNA 2 katına çıkar. PCR reaksiyonu genel olarak 30–32 döngüden oluşur (101,104). Başlangıç denaturasyonu için genomik DNA gibi karmaşık kalıpların denature olmasını sağlamak üzere yüksek sıcaklıklar (90–101^{o}C) kullanılır. Ancak PCR sırasında genellikle en etkin sıcaklığın 92–96 ^{o}C olduğu saptanmıştır. Denaturasyon için ardışık primerlerin bağlanması aşamasındaki bağlanma sıcaklığı oranının saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için son derce önemlidir.

Primerlerin uzaması sırasındaysa genelde DNA polimerazların polimerizasyon aktivitesi için en cazip sıcaklık olan 72 ^{o}C kullanılmaktadır. Uzama işlemi için genelde 2 dakika yeterli olsada daha uzun amplikasyonlar için bu süre arttırılabilmektedir (101,103).

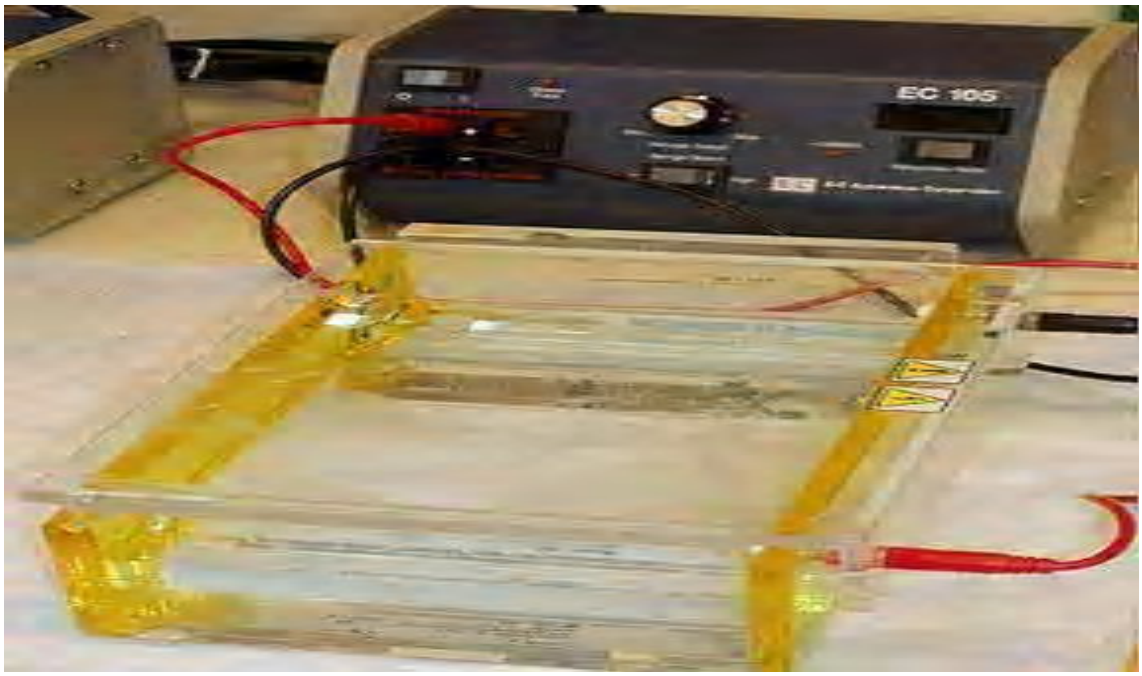


Şekil 2.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR) Sıcaklık Değişimleri (106)

2.7.2. Agaroz Jel Elektrofezi

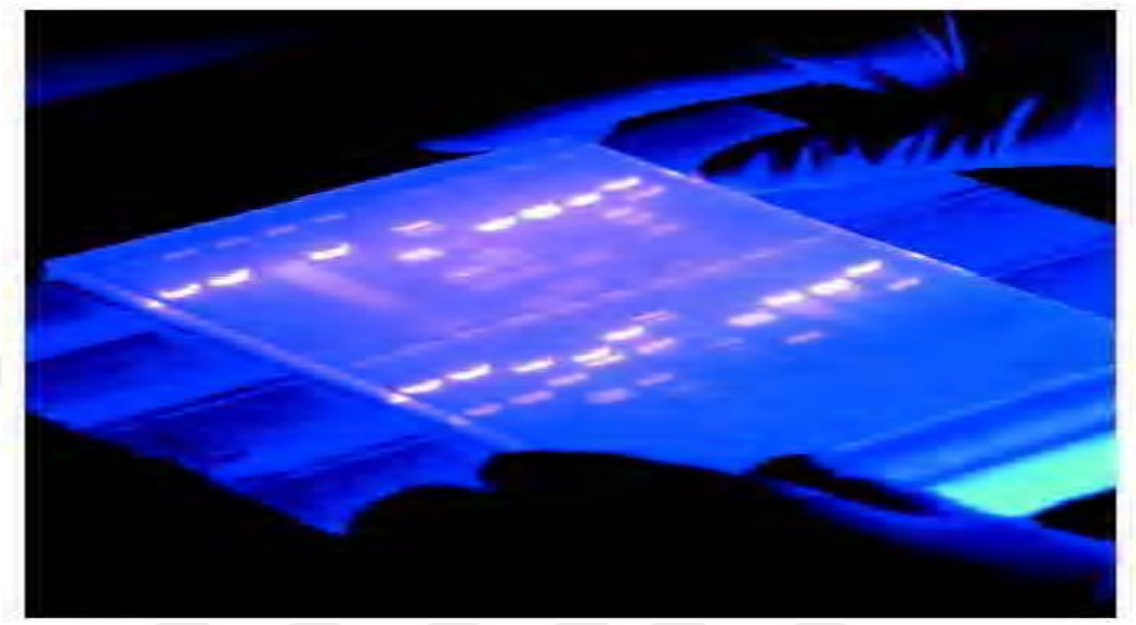
Elektroforez farklı büyüklükte, konformasyonda veya yükte sahip olan makromolekülleri, özellikle protein ve nükleik asitleri; saflaştırmak, ayırmak ve molekül ağırlıklarını saptamak amacı ile moleküler biyolojide ve biyokimyada sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (103).

Elektroforezde yüklü moleküllere, elektriksel bir alan uygulandığında, sıvı ortam içerisinde hareket hızları karşılaştırılır. Artı yüklü moleküller (katyonlar) eksi yüklü elektroda (katoda), eksi yüklü moleküller (anyonlar) artı yüklü elektroda (anoda) hareket ederler. En sık kullanılan elektroforez yöntemi, agaroz jel elektroforez yöntemidir. 200 ila 50.000 bç boyutları arasındaki RNA ve DNA moleküllerini tanımlamakta kullanılan standart usul destek ortamı olarak agarozun kullanıldığı elektroforezdir. Jel, elektroforez tamponuna konmuş agarozun yüksek sıcaklıkta çözündürülmesi ve yaklaşık 50 ^{o}C kadar soğutulması ile jel tepsilerine dökülür. Ayırımı yapılacak örnek taraklarla oluşturulmuş kuyucuklara konur ve ayırım tamamlanıncaya kadar voltaj uygulanır . DNA örnekleri jel içinde göç eder (103,104). Şekil 1.11(107)



Şekil 2.11. Agaroz Jel Elektroforezi Cihazı (107)

DNA, jeldeki etidyum bromür ile veya elektroforezden sonra jelin etidyum bromür çözeltisine batırılması ile boyanır. UV ışık ile aydınlatılınca, DNA turuncu bir bant olarak görülür (102). Şekil 2.12(108)



Şekil 2.12. Agaroz Jel Elektroforezi Jel Görüntüsü (108)

2.7.3. Sınırlandırılmış Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)

RFLP, Genomik DNA' nın özel bir restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi ve kesilen bu DNA parçalarının agaroz jel elektroforez sisteminde ayrıştırılmasıyla oluşturulan, DNA profillerinin incelenmesine imkan tanıyan bir yöntemdir. Bakterilerde bulunan bu enzimler DNA' daki özgün dizileri tanıyarak kesme işlemini, tanıma bölgesinde veya bu bölgenin dışında başka özel bir dizide gerçekleştirirler. Bu yöntem ile tek nükleotit polimorfizmlerinin genotiplendirilmesi iki basamakta gerçekleştirilmektedir. İlk basamak DNA bölgesindeki SNP (Single Nucleotid Polymorphism-Tek Nükleotid Polimorfizmi) çevresindeki yaklaşık 200 baz çiftinin milyarlarca kez PCR ile çoğaltılarak, polimorfik bölgenin genotiplenmesi amacı ile PCR ürününün sekanslanmasına veya jel elektroforezinin ardından enzimle kesilmesine dayanmaktadır (Linn ve Arber 1968). RFLP yönteminde, örnek DNA bir veya daha fazla restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildikten sonra, elde edilen DNA fragmentlerinin moleküler büyüklükleri göre jel elektroforezde yürütülerek moleküler ağırlık standardı (marker) yardımıyla belirlenebilmektedir. Jel, ethidium bromid ile

muamele edildikten sonra fragmentler UV ışık altında görünür hale getirilerek jel profilindeki bantların sayılarına, büyüklüklerine bakılarak genotiplenebilir ve lokusa ait genotip/allel sıklıkları saptanabilir (103,104,109).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

1. PCR Cihazı(SensoQuest)
2. Vorteks Cihazı (Lonza)
3. Santrifüj Cihazı(Jouan)
4. Hassas Terazi (Libror AEG-220)
5. Derin Dondurucu (Arçelik)
6. Buzdolabı (Vestel)
7. Otomatik Pipet (Abimed Langenfeld)
8. Elektroforez(Bıo-Rad)
9. UV transilliminatör(Vilber Lourmat)

3.1.2.Sarf Malzemeler

1. Cam Malzemeler
2. Eppendorf Tüpleri
3. Distile Su
4. Tris (SIGMA Katalog Numarası T-2315)
5. Tüplük
6. Etidium Bromid (SIGMA Katalog Numarası E-8942)
7. 10xPCR Tamponu (TAKARA)
8. dNTP (TAKARA)

9. MgCl (TAKARA)

10. Taq DNA Polimeaz (TAKARA)

11. Falkon tüpleri

12. Hinf I restriksiyon enzimi(Roche Katalog Numarası:10 779 652 001)

13. MboII restriksiyon enzimi(TAKARA Katalog Numarası:1145A

3.2.YÖNTEMLER

3.2.1. DNA Örneklerinin Toplanması

Çalışmamızda daha önce çalışılmış hasta ve kontrol gruplarından DNA örnekleri kullanılmıştır.

3.2.2. METOD

3.2.3. Moleküler Çalışma Basamakları

3.2.3.1.PCR

DNA'nın istenilen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması, her bir polimorfizim için ayrı olmak üzere aşağıda verilen PCR miksleri hazırlandı. Bu mikslerde değişen sadece çoğaltılmak istenen bölgeye ait primer çiftleridir. Diğer parametreler değişmemektedir.

10xPCR Tamponu	→	2 µl
dNTP(2,5mM)	→	1.2 µl
MgCl (25mM)	→	1.2 µl
Primer-1 (10pm)	→	1.2 µl
Primer-2 (10pm)	→	1.2 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	→	0.2 µl
DNA	→	2 µl

Eklenir ve distile su ile total volüm 20µl' ye tamamlanır.

Tablo 3.1. MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizmleri için kullanılan prımer dizileri

677CT P_1(sense)	5 '-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'
677CTP_2(antisense)	5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'
1298AC P_1(sense)	5'-GCAAGTCCCCCAAGGAGG-3'
1298ACP_2(antisense)	5'-GGTCCCCACTTCCAGCATC-3'

3.2.3.1.1. MTHFR 677C→T PCR Programı

94°C	5dk.	Denatürasyon periyodu
94°C	1dk.	
64°C	1dk.	40 döngü
72°C	1dk.	
72°C	5dk.	Ekstensiyon

3.2.3.1.2. MTHFR 1298A→C PCR Programı

95°C	5dk.	Denatürasyon periyodu
95°C	1dk.	
61°C	1dk.	40 döngü
73°C	2dk.	
73°C	6dk.	Ekstensiyon

PCR Ürünlerinin Elektroforezi:

PCR işleminin ardından hedef DNA bölgesinin amplifikasyonunun doğru gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrol edilmesi için PCR ürünleri jelde koşturulur.

3.2.3.2.1.Agaroz Jel Hazırlanması

3.2.3.2.1.1. %2'lik Agaroz Jel Hazırlanması

2 gr Agaroz, TBE tamponu ile 100 ml' ye tamamlanır, kaynatılarak erimesi sağlanır, jel kalıbına dökmeden önce yaklaşık 65 ^{O}C'ye kadar soğutulur. İçerisine 4,5µl etidyum bromo eklenir, karıştırılır ve jel kalıbına dökülür, kuyucukların oluşmasını sağlayan tarak takılır ve donmaya bırakılır.

3.2.3.3. PCR Ürününün Agaroz Jele Yüklenmesi

Jelin ilk ve son kuyucuğuna ürünün bant boyutunu karşılaştırmak amacıyla DNA boyut markırı yüklendi. PCR ürününden 0,5'lik ependorf tüpe 8µl alındı ve üzerine 2µ l yükleme tamponu eklendi. Mikropipetle karıştırıldıktan sonra sırasıyla her bir PCR ürünü kuyucuğa yüklendi. % 2' lik agaroz jelde 120 V da 40 dakika elektroforez yapılır.

3.2.3.4. MTHFR 677 C→T Polimorfizim Analizi Enzim Muamelesi

MTHFR 677C→ T polimorfizminde C→ T baz çiftinin değişimi bir HinfI(G→ ANTC) restriksiyon bölgesi oluşturur HinfI restriksiyon muamelesi;

2 µl buffer

1µl(5 U) enzim (HinfI) 10µl PCR ürünü

distile su ile 20µl' ye tamalnır. 37^{0}C' de 1 gece inkübe edildi.

3.2.3.5. Elektroforez İşlemi

Enzimle kesilmiş PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturuldu. Yabanıl tip (677CC) 198 bp'de tek bant gösterir, heterozigotlar(677CT) 198,175 ve 23 bp fragmentlerini gösterir. Homozigot mutantlar(677TT) 175 ve 23 bp fragmentleri gösterir. Majör görünür bantlar 198 ve 175 bp'lık bantlardır.

3.2.3.6.MTHFR 1298 A→C Polimorfizim Analizi Enzim Muamelesi

MTHFR 1298A→ C polimorfizminde A→C baz çiftinin değişimi bir

MboII (GAAGA(N)8/7) C restriksiyon bölgesi oluşturur. MboII restriksiyon muamelesi;

2 µl buffer

1µl(5 U) enzim (MboII) 10µl PCR ürünü

distile su ile 20µl' ye tamamlanır. 37^0C' de 1 gece inkübe edildi.

3.2.3.7. Elektroforez İşlemi

Enzimle kesilmiş PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde 80 voltta 60 dakika koşturuldu. Yabanıl tip (1298AA) 56, 31, 30, 28 ve 18 bp'lıl 5 fragment gösterir. Heterozigotlar (1298AC) 84, 56, 31, 30, 28 ve 18 bp'lık 6 fragment gösterir. Homozigot mutantlar (1298CC) 84, 31, 30 ve 18 bp'lık 4 fragment gösterir. Majör görünür bantlar 84, 56, 31 ve 30 bp'lık bantlardır.

4.BULGULAR

Bu çalışmada 53 belirsiz azospermi, 55 nonobstrüktif azospermi, 62 obstrüktif azospermi 51 oligosipermi ve 57 CABVD infertil erkelerin DNA örnekleri alınmıştır. 63 fertil erkekten(çocuk sahibi) edilen DNA örnekleri de kontrol amaçlı olarak alınmıştır.

4.1.PCR BULGULARI

DNA'sı elde edilen hasta ve kontrol grupları PCR'da amplifiye edildikten sonra ürünler %2'lik agoroz jelde koşturularak değerlendirildi. İnfertil ve kontrol örneklerinde MTHFR 677CT 198 bp'de MTHFR 1298AC 163 bp'de PCR ürünleri oluşturuldu.

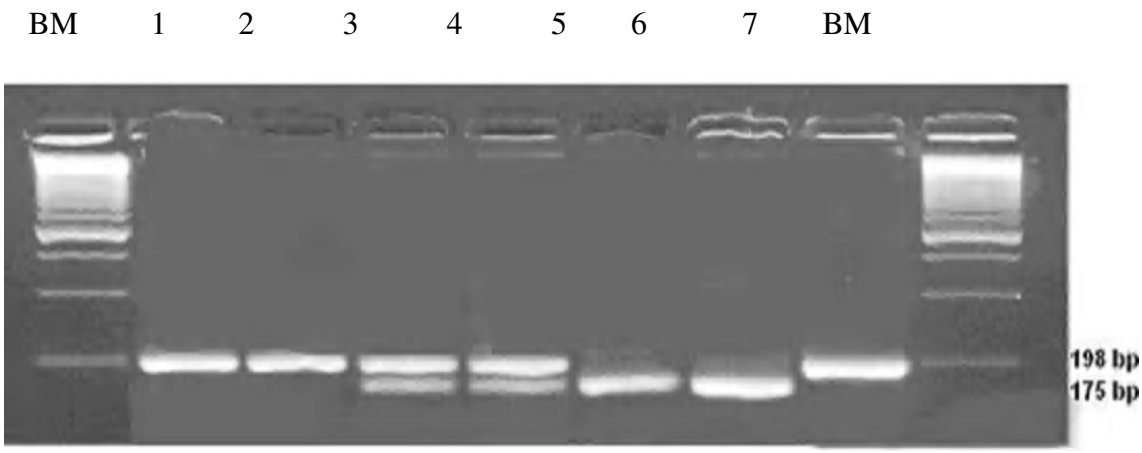


Şekil 4.1. MTHFR 677 C→T 1298 A→C %2'lik agoroz jel görüntüsü.

4.2.RFLP Analizi

4.2.1.MTHFR 677C→T Polimorfizimi

PCR ile amplifiye edilen gen ürünleri Hinf I restriksiyon endonükleaz ile muamele edildi. MTHFR 677C→T polimorfizimi için %3'lık agoroz jelde 100V'da 60 dakika koşturularak yababıl tip (677CC), heterozigot (677CT) ve homozigot (677TT) olguları tespit edildi. Yabanıl tip198 bp, heterozigot 198 bp ve 163 bp ve homozigotlar ise 163 bp bant gösterdi.



BM → Boyut Marker, 1-2→ Homozigot Normal,3-4 →Heterozigot,
5-6 →Homozigot Mutant 7→ PCR Ürünü (enzimle kesilmemiş)

Şekil 4.2. MTHFR 677 C→T Polimorfizminin %3'lik agoroz jel görüntüsü.

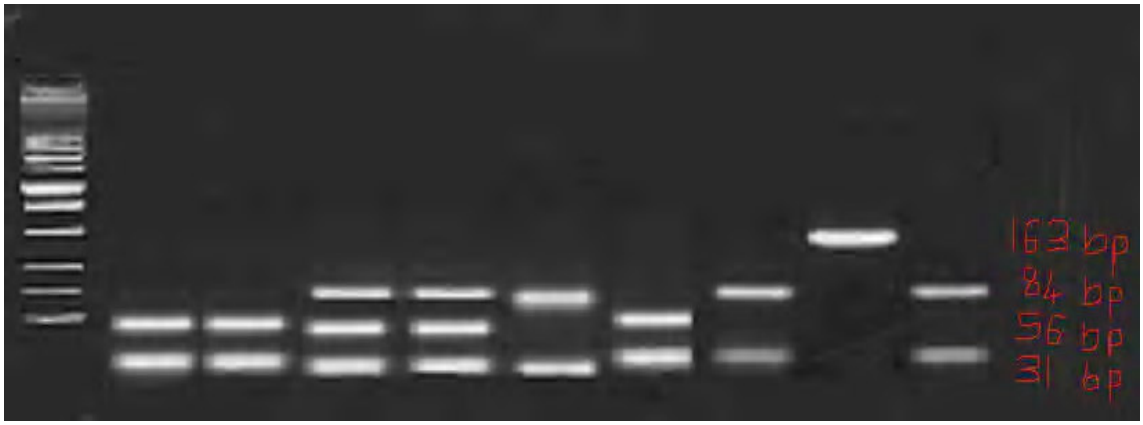
MTHFR 677CC, 677CT ve 677TT için allel sıklığı 341 kontrol ve infertil toplamı arasında sırasıyla % 48.97, % 40.47 ve % 10.56 olarak tespit edildi. Tüm infertile hastalarda allel sıklıkları ile ayrı ayrı infertile grubları ve kontrol grubu arasında bu gen bölgesi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 4.1).(Khi kare testi uygulandı p>0.05 bulundu.)

MTHFR 677CC ve 677CT genotipinin tüm infertil vakalarında %47.85 ve %41 kontrol amaçlı vakalarda ise %53.97, %38.10 olarak tespit edildi. MTHFR 677 varyant allel için homozigot olan tüm infertil vakalarda (%11.15) kontrol amaçlı vakalardan (%7.93) daha fazla taşımaktadır(Tablo 4.1). (Khi kare testi uygulandı p>0.05 bulundu.)

4.2.2.MTHFR 1298 A→C Polimorfizimi

PCR ile çoğaltılan gen ürünleri MboII restriksiyon endonükleaz ile muamele edildi. MTHFR 1298 A→C polimorfizimi için %3'lik agoroz jelde 80V'da 75 dakika koşturularak yabanıl tip (1298AA), heterozigot (1298 AC) ve homozigot (1298CC) varyasyonları tespit edildi. Tüm infertil hasta grublarında (278) MTHFR 1298AA, 1298AC ve 1298CC genotipiniin dağılımı %48.20, %41.73 ve %10.07'dir. Kontrol grubunda (63) %50.80, %42.85 ve %6.35'dir. Homozigot formun (1298CC) kontrol grubunda tüm infertil grublardan az bulunması dikkat çekicidir(Tablo 4.2). (Khi kare testi uygulandı p>0.05 bulundu.)

BM 1 2 3 4 5 6 7 8 9



BM → Boyut Marker 1-2-6→ Homozigot Normal 3-4 →Heterozigot 5-7-9 Homozigot Mutant 8→PCR Ürünü

Şekil 4.3. MTHFR 1298A→C Polimorfizminin %3'lik agoroz jel görüntüsü.

Ayrıca kontrol vakalarında MTHFR 677C→T ve 1298 A→C çift heterozigot formları (%20) tüm infertil grub (grub ayrımı yapılkmaksızın) vakalarından (%13) yaklaşık iki kat fazla bulunmuştur.

Tüm infertil ve kontrollerde yabanıl tip, heterozigot formda alleller görülmüştür. Kontrol gubunda MTHFR 677TT ve 1298 CC homozigot alleli birlikte bulunduran hiç bir vaka yokken infertillerde ise toplamda 6 infertil erkeğin her iki homozigot allelli birlikte bulundurdu tespit edilmiştir.

Tablo 4.1.MTHFR 677C→T Polimorfiziminin erkek infertile grublar ve kontrol gruplarında karşılaştırılması

Gruplar	677CC (Normal)		677CT (Heterozigot)		677TT (Homozigot)		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Belirsiz Azospermi	25	47,17	21	39,62	7	13,21	53
Nonobstrüktif Azospermi	27	49,10	24	43,63	4	7,27	55
Obstrüktif Azospermi	27	43,54	29	46,78	6	9,68	62
Oligospermi	26	50,98	17	33,33	8	15,69	51
CABVD	28	49,12	23	40,35	6	10,53	57
Kontrol	34	53,97	24	38,10	5	7,93	63
Toplam	167	48,97	138	40,47	36	10,56	341

p>0,05

Tablo 4.2. MTHFR 1298A→C Polimorfiziminin erkek infertile grublar ve kontrol gruplarında karşılaştırılması

Gruplar	1298AA (Normal)		1298AC (Heterozigot)		1298CC (Homozigot)		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Belirsiz Azospermi	26	49,06	23	43,40	4	7,54	53
Nonobstrüktif Azospermi	24	43,64	25	45,46	6	10,90	55
Obstrüktif Azospermi	29	46,77	27	43,55	6	9,68	62
Oligospermi	27	52,94	19	37,25	5	9,81	51
CABVD	28	49,12	22	38,60	7	12,28	57
Kontrol	32	50,80	27	42,85	4	6,35	63
Toplam	166	48,68	143	41,94	32	9,38	341

p>0,05

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızın sonuçları MTHFR genin 677C→T ve 1298A→C polimorfizmi ile erkek infertilitesi arasında anlamlı bir ilişki olmadığını gösterir (SPSS 24 istatistik programında analiz yapıldı ve p>0,05 çıktı). Erkek infertilitesi genetik ve epigenetik faktörlerin birlikte rol oynadığı oldukça karmaşık bir konudur. Bilinen diğer infertilite nedenlerinin dışlandığı olguların ancak %15-30'unda genetik bir neden gösterilebilir (2,4,5). Bu da, erkek infertilitesinin önemli bir kısmının nedeninin açıklanamıyor olmasının(idiyopatik) altında yatan gerçekliktir. Epigenetik değişiklikler, idiyopatik erkek infertilitesinin olası bir açıklamasıdır. En önemli epigenetik mekanizma da DNA metilasyonudur(2,5,7,17).

Sperm DNA'sında birçok metilasyon hedefi bulunmaktadır. Bu hedeflerin büyük bir kısmını milyonlarca tekrarlayan DNA elemanı oluşturur. Tekrarlayan DNA elemanlarının metilasyonu ile amaç, parazitik ya da transpoze gen ifadelenmesinin önüne geçmektir. DNA'daki diğer bir metilasyon hedefi ise tek kopya genlerdir. Bunların içinde hem promotorundaki CpG adalarının metilasyonu ile düzenlenen binlerce gen, hem de belirli sayıdaki imprint genler yer alır. Tek kopya genlerde izlenen metilasyon paterni son derece dokuya özgüdür. Sperm DNA metilasyonunun böyle geniş bir spektrumda izlenmesi tüm genomun incelendiği bir genel analizin sağlayacağı bilginin kısıtlı olmasına neden olur. Metilasyon çalışmalarının sekans spesifik olarak yapılması daha yararlıdır(8,9,10,21,19).

Erkek gametogenezinde yaşanan herhangi bir sorunun imprint olmayan spesifik bir gende meydana gelen epigenetik farklılıktan dolayı olabileceği ise ilk kez Navarro-Costa ve ark. tarafından öne sürülmüştür. Germ hücre hattı düzenleyicisi olan DAZL geni promotorunda görülen artmış metilasyon defektinin normozoospermik bireylere kıyasla sperm anomalisi olan grupta anlamlı derecede daha çok olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular daha geniş bir başka çalışmada da doğrulanmıştır. Daha sonra aralarında

MTHFR'nin de bulunduğu PAX8, NTF3,SFN, HRAS gibi bir çok genin epigenetik değişimlerinin erkek infertilitesinde rol oynayıp oynamadığının incelendiği çok sayıda çalışma yapılmıştır ve halen de yapılmaktadır(15,16,45,89,94,104). Çoğu çalışmada incelenen genin epigenetik değişimi erkek infertilitesi ile ilişkili ama asıl olarak sperm kalite bozukluğu ile korele bulunmuştur.Sperm epigenetik değişikliklerinin bireyin yaşamsal dinamiklerine bağlı olarak sperm kalitesinde bir bozukluk gözlenmeksizin; yani normozoospermi ile; infertiliteye neden olup olmayacağı halen net olarak aydınlatılamamış bir konudur. Bu anlamda çalışmamız belirli bir genin epigenetik değişikliğinin sperm anomalisine yol açmaksızın idiyopatik erkek infertilitesine yol açıp açmadığını gösteren bir çalışmadır(7,8,15,17,23).

Erkek infertilitesi ile MTHFR geni ilişkisi literatürde birkaç çalışmada incelenmiştir. Khazamipour ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada nonobstrüktif azoospermi bulunan 50 infertil erkekle 50 sağlıklı kişi karşılaştırılmıştır (15). Azoospermik 50 erkeğin periferal kanı ile 50 sağlıklı erkeğin periferal kanında MTHFR gen promotoru metilasyonu bakımından anlamlı fark bulunmazken infertil grubun 32'sinin testis biyopsilerinde MTHFR gen promotoru hipermetilasyonu tespit edilmiştir. Bu doku spesifik farklılığın, MTHFR geninin susturulmasının azoospermiye yol açması muhtemel bir mekanizma olduğuna işaret ettiği belirtilmiştir. Çalışmada kontrol grubu olarak yalnızca sağlıklı bireylerin periferal kanı kullanılmış, testis biyopsisi veya spermiogramı konu edilmemiştir. Bu çalışma infertilite hakkında fazla demografik veri içermemekle beraber MTHFR gen promotorunda dokuya özgü metilasyon farklılığı olabileceğine dikkat çekmektedir. Wu ve arkadaşları, açıklanamayan erkek infertilitesiyle sperm DNA'sı MTHFR geni promotorunda tespit edilen hipermetilasyonunun ilişkili olduğunu daha önce göstermiştir (16). Açıklanamayan infertilite nedeniyle değerlendirilen 94 erkeğin 54 sağlıklı fertil erkekle kıyaslandığı çalışmada, aslına çalışma grubundaki 64 erkeğin sperm parametrelerinde bozukluk bulunduğu ve gerçek açıklanamayan infertilite grubunun 30 bireyden ibaret olduğu belirtilmiştir. Yazarlar sperm MTHFR gen promotoru hipermetilasyonunun açıklanamayan infertilite ile kuvvetli ilişkisi bulunduğu yorumunda bulunurken gerçekte bu ilişkiyi sadece oligoastenoteratozoospermik olgularda gösterdikleri söylenebilir(109,111,116).

Muhammad ve arkadaşlarının Pakistan'da 437 infertil erkek ile (57 azospermik, 66 oligospermik, 44 astenospermik, 29 teratozoospermik, 20 oligoastenospermik ve 221 normospermik) ve 218 fertil erkek ile yapılan çalışmada MTHFR 677C→T geni TT alleli, TT ve CT alleli açısından CC alleli ile karşılaştırılmıştır. Homozigot resesif allel ve birleştirilmiş alleller için p değeri 0.005'den küçük çıkmıştır ve çalışmada MTHFR 677C_T geninin infertilitede önemli olduğu sonucuna varılmıştır(109,105).

Dwi A. Suryandari ve arkadaşlarının Endonezya'da 2012 yılında azospermik ve oligo spermik infertil erkekler ile yaptıları çalışmada MTHFR 677C→T ve MTHFR 1298A→C gen polimorfizminin istatisel açıdan erkek infertilitesinde önemli olmadığı sonucunu bulunmuşlardır(p>0.005)(22,106,107).

Eloualid ve arkadaşlarının 344 infertil erkek ve 450 fertil erkek üzerinde yapılan çalışmalarında 677CC, 677CT ve 677TT allelleri için şu sonuçları bulmuşlardır. Kontrol grubunda %50.87, %41.45 ve %7.68 azospermiklerde %59.09, %33.64 ve %7.27 oligospermiklerde %59.55, %33.71 ve % 6.74 çıkmıştır(p>0.005). 1298AA, 1298AC ve 1298CC allelleri için de şu sonuçları bulmuşlardır. Kontrol grubunda %53.62, %43.92 ve %2.46 azospermiklerde %60.91, %35.45 ve %3.64 oligospermiklerde %55.06, %37.08 ve %7.86 çıkmıştır(p>0.005). MTHFR 677C→T ve MTHFR 1298A→C gen polimorfizminin istatisel açıdan erkek infertilitesinde önemli olmadığı sonucu bulunmuştur(78,108,109,110).

Düşük frekanslı genlerdeki allelik farklılıklar, erkek infertilitesinde özenle incelendiğinde geniş bireyler arası farklılıklar hesaplanabilir. Bu genlerden birinde bir varyasyon taşıyan birey için artmış infertilite riskinin küçük olduğu varsayılabilir fakat bu varyasyonların bazılarının popülâsyondaki yüksek frekansları, popülâsyonun yüksek risk altında olduğunu ileri sürmektedir (36,68).

Yıllar geçtikçe, erkek infertilitesi ve genetik polimorfizm arasındaki ilişkiye odaklanan çok sayıda genetik çalışma yapılmıştır. Lee ve arkadaşları, folat metobolizma yolunda önemli bir rol oynayan, DNA sentezi ve metilasyonu için intraselüler folat havuzunu düzenleyen metilenhidrofolat redüktaz (MTHFR) genini büyük önem vermişlerdir (,27,91,111,112,113,114).

MTHFR 677C→T ve MTHFR 1298A→C gen polimorfizm araştırmasında Yang ve arkadaşları farklı ülkelerde yapılan çalışmaları toplmamış ve meta analizi yaprarak sonuçları derğerlendirmiştir. Asya kökenlilerde p değeri 0.005'den büyük çıkmış bazı

Kafkas kökenlilerde ise p değeri 0.005'den küçük çıkmıştır. Buna göre Kafkas etnik kökenli erkeklerde infertilitede bu iki gen polimorfizmin etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak Asya etnik kökenli erkelerde bu iki polimorfizmin etkili olmadığı sonucuna varmışlardır(30) Tablo 5.1(30,115,116).

Tablo 5.1 Farklı ülkelerdeki Kafkas kökenli ve Asya kökenli erkekler üzerinde yapılan MTHFR 677CT ve 1298AC polimorfizm çalışmalarının meta-analizi sonuçları

	MTHFR gene C677T polymorphism												
No.	Author	Year	Country	Ethnicity			Case				Control		Hardy-Weinberg (P)
					Total	CC	CT	TT	Total	CC	CT	TT	
1	Bezold et al.	2001	Germany	Caucasian	255	114	93	48	200	92	89	19	0.705
2	Stuppia et al.	2003	Italy	Caucasian	93	37	37	19	105	33	43	29	0.065
3	Ebisch et al.	2003	Netherlands	Caucasian	77	42	28	7	113	50	48	15	0.522
4	Singh et al.	2005	India	Caucasian	151	105	40	6	200	163	37	0	0.149
5	Park et al.	2005	Korea	Asian	373	105	205	63	396	145	200	51	0.161
6	Lee et al.	2006	Korea	Asian	360	115	181	64	325	118	166	41	0.138
7	Paracchini et al.	2006	Italy	Caucasian	59	11	32	16	46	18	21	7	0.830
8	A et al.	2007	China	Asian	355	130	160	65	252	128	95	29	0.085
9	Dhillon et al.	2007	India	Caucasian	179	81	77	21	200	70	100	30	0.556
10	Sun et al.	2007	China	Asian	182	27	86	69	53	15	28	10	0.630
11	Ravel et al.	2009	France	Caucasian	250	118	101	31	132	49	52	31	**0.023**
12	Gava et al.	2011	Brazil	Caucasian	156	81	60	15	233	167	53	13	**0.003**
13	Safarinejad et al.	2011	Iran	Caucasian	156	50	80	26	328	144	148	36	0.825
14	Liu et al.	2011	China	Asian	75	27	38	10	72	40	28	4	0.753
15	Qiu et al.	2011	China	Asian	271	75	112	84	180	63	85	32	0.720
16	Vani et al.	2012	India	Caucasian	230	188	42	0	206	158	42	6	0.132
17	Mfady et al.	2014	Jordan	Caucasian	150	67	63	20	150	74	67	9	0.221
18	Naqvi et al.	2014	India	Caucasian	637	447	154	36	364	275	79	10	0.145
19	Karimian et al.	2014	Iran	Caucasian	118	51	59	8	132	77	52	3	0.087
20	Li et al.	2014a	China	Asian	82	14	36	32	133	36	61	36	0.340
21	Ni et al.	2015	China	Asian	296	117	135	44	204	84	94	26	0.970
	MTHFR gene A1298C polymorphism												
No.	Author	Year	Region	Ethnicity			Case				Control		Hardy–Weinberg (P)
					Total	AA	AC	CC	Total	AA	AC	CC	
1	Park et al.	2005	Korea	Asian	373	237	118	18	396	269	111	16	0.294
2	Lee et al.	2006	Korean	Asian	360	222	120	18	325	213	98	14	0.526
3	Dhillon et al.	2007	India	Caucasian	179	90	80	9	200	103	84	13	0.451
4	Ravel et al.	2009	French	Caucasian	250	131	94	25	113	54	46	13	0.507
5	Singh et al.	2010	India	Caucasian	151	66	76	9	140	64	74	2	**0.000**
6	Safarinejad et al.	2011	Iran	Caucasian	164	75	70	19	328	149	141	38	0.599
7	Gava et al.	2011	Brazil	Caucasian	156	71	62	23	233	130	89	14	0.811
8	Eloualid et al.	2012	Morocco	Caucasian	344	205	122	17	690	370	303	17	**0.000**
9	Mfady et al.	2014	Jordan	Caucasian	150	71	61	18	150	59	75	16	0.273
10	Karimian et al.	2014	Iran	Caucasian	118	59	44	15	132	70	48	14	0.194
11	Li et al.	2014a	China	Asian	82	49	29	4	133	88	36	9	0.059
12	Li et al.	2014b	China	Asian	162	101	54	7	50	34	15	1	0.656
13	Ni et al.	2015	China	Asian	296	181	106	9	204	137	62	5	0.515

Kelly ve aradaşlarının fareler üzerinde yaptıkları araştırmada, yetişkin erkek fare testislerinde MTHFR seviyesi yüksek çıkmıştır. MTHFR geni nakavt farelerde ise anormal spermatogenez ve infertilite gözlenmiştir. Bu çalışma infertilite ve MTHFR geninin aktivitesi arasında bir ilişki olduğunu göstermesi açısından son derece katkı vericidir (110).

MTHFR geninin gerek genetik gerekse biyokimyasal mekanizmalardaki anahtar rolü ve multifaktöryel etkenlere açık yapısı MTHFR ile ilişkili hastalıklar özellikle göz önünde bulundurulmalıdır. MTHFR azalan aktivitesi azalan DNA metilasyonunun yol açtığı düşük SAM düzeylerinde beklenebilir. Etnik ve bölgesel prevelans farklılıklarıda ayrıca önemsenmelidir. Bu çalışmamızında küçük de olsa bir katkı sağlanacağını düşünmekteyiz.

MTHFR 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizminin Türkiye'de yapılan tek bir çalışmada Vardarlı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada azospermik ve oligospermik infertile erkeklerde sırayla homozigot allelin popülasyon sıklıkları %10 - %14 ve %12-%16 olarak verilmiştir(141). Bizim çalışmamızda beş farklı infertil erkek grubunda %7.54 ile %15.69 arsında değerler gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda homozigot frekansı nisbeten daha azdır ama yinede iki çalışmada çıkan sonuçlar birbirlerini destekler niteliktedir(111).

Buradan sağlık durumu her ne olursa olsun her bir bireyin genetik olarak kendine özgül kimyasal oluşuma sahip olduğu ve bu nedenle beslenmeye, çevreye ve farmakolojik etkilere kendine has cevap vereceği sonucuna arayabiliriz. Bu kimyasal bireysellik oluşumu ilk defa yüzyıl önce Sir Archibald Garrod tarafından öngörülmüş ve bu görüş bugün de geçerliliğini korumaktadır (112).

Çevre ile birey arasındaki ilişkiyi, genetik çeşitliliğin nasıl etkilendiğini bize açıklayan polimorfik allellerdir. Regülatör bölgedeki polimorfik alleller, genlerin transkripsiyonel regülasyonunu etkileyerek fenotiplerin belirlenmesinde önemli rol oynar (112).

Bizim çalışmamızda MTHFR 677C→T ve 1298A→C polimorfiziminin yabanıl tip, heterozigot ve homozigot varyasyonlarının infertil ve kontroller arasında hemen hemen eşit düzeylerde bulunması bu polimorfizmin infertilite üzerinde etkili olmadığını göstermektedir.

Eloualid ve arkadaşlarının yaptığı araştırmalar ve diğer birçok araştırma da bizim çalışmamımızı destekler nitelikte, erkek infertilitesi ve MTHFR 677C→T ve 1298A→C polimorfizmlerinin arsında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir.

MTHFR polimorfik lokusu (677C→T) endometrial kanser, servikal intraepitelyal neoplasi, meme ve ovaryum kanserlerinin artmış riskiyle ilişkilendirilmiştir (113). Erkek infertilitesi ve MTHFR gen polimorfizmi ile ilgili bizim bulgularımız ve diğer

çalışmalar bu çalışmaların çoğuyla uyumluluk göstermemektedir. Fakat bu analizler küçük sayıdaki bireyler üzerine odaklanmıştır ve diğer çalışmalarla konfirme edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

MTHFR' erekek infertilitesindeki rolü değişik popülasyonlar arasında ve aynı popülasyon içinde farklı çevrelerde belirgin farklılıklar gösterir. Erkek infertilitesi için MTHFR 677C→T ve 1298A→C polimorfizimi karşılaştırıldığında Fransa, Birezilya, Endonezya ve Morokko'da yaşayan Kafkas kökenliler için bu gen polimorfizmleri önemlilik arz ederken diğer ülkelerde yaşayan Kafkas kökenliler için önemlilik arz etmiyor. Riskin önemli bir bölümünün çevredeki mutajenlere ve karsinojenlere bağlanabileceği görülmektedir. Çevredeki karsinojenlerin yapısı, artmış riskin belirlenmesi ve popülasyonun bunlardan korunma yollarının saptanması için önemlidir (30,112).

Varyant MTHFR 677TT genotipli bireyler 677CC yabanı tiple kıyaslandığında in vitro da %30 enzim aktivitesine sahip oldukları görülmüştür. 677CT heterozigotlarda ise %65 normal enzim aktivitesi görülür. İn vitro da her iki (677 CT ve 1298 AC) heterozigot çifti için de enzim aktivitesi açık değildir (114, 115,116).

Literatürde çift heterozigotların (677 CT, 1298 AC) değerlendirildiği çalışmalarda kanser için gösterdiği bir koruyucu etki oluşturduğu görülmektedir. Ancak erkek infertilitesi için böyle bir çalışma yapılmamıştır. Bizim çalışmamızda heterozigot çiftleri birlikte değerlendirilmiş anlamlı fark bulunamamıştır. Bu genlerin heterozigot formlarının birlikte değerlendirildiği çok daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bizim çalışmamızda folat metabolizmasının anahtar rol oynayan enzimlerden MTHFR 677 C→T ve 1298 A→C polimorfizimleri incelenmiştir. Bu polimorfizimlerin homozigot formlarının erkek infertil vakalarda artmış olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu artış istatiksel olarak bir önem arz etmemektedir. Çevresel etmenler, etnik köken, yaş, coğrafik bölge farklılıkları ve hastalık geçmişi göz önünde bulundurularak yapılacak çalışmaların bizleri daha iyi sonuçlara ulaştıracağı kanısındayız.

6.KAYNAKLAR

1. T. A, Potdar, N, Jeve, Y. B. and Nardo, L. G. Definition and Epidemiology of Unexplained Infertility. Obstetrical and Gynecological Survey, 2014: 69(2), 109-115.
2. Sadeghi M. R. Unexplained Infertility, the Controversial Matter in Management of Infertile Couples. Journal of Reproduction and Infertility, 2015: 16(1.
3. Esteves S. C., Hamada A., Kondray V., Pitchika A., Agarwal A. What every gynecologist should know about male infertility: an update. Archieves on Gynecology and Obstetrics 2012: 286, 217–229.
4. Gunn D. D. and Bates, G. W. Evidence-based approach to unexplained infertility: a systematic review. Fertility and Sterility, Şubat, 2016: pii:S0015-0282(16)00085-6.
5. Gleicher N, Barad, D. Unexplained infertility: Does it really exist? Human Reproduction, 2006: 21 (8), 1951–1955.
6. Rajender S., Avery K. ve Agarwal A. (2011). Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. Mutation Research, 727, 62-71.52
7. Singh K. and Jaiswal D. One-Carbon Metabolism, Spermatogenesis, and Male Infertility. Reproductive Sciences, 2012: 20(6) 622-630.
8. Krausz C., Sandoval J., Sayols S., Chianese C., Giachini C., et al. Novel Insights into DNA Methylation Features in Spermatozoa: Stability and Peculiarities. PLOS One, 2012:7(10): e44479.
9. Gupta N., Gupta S., Dama M., et al. Strong association of 677 C>T substitutions in the MTHFR gene with male infertility—a study on an Indian population and a meta analysis. PLOS One, 2011: 6(7), e22277.

10. Montjean D., Benkhalifa M., Dessolle L. et al. Polymorphisms in MTHFR and MTRR genes associated with blood plasma homocysteine concentration and sperm counts. Fertility and Sterility, 2011: 95(2), 635-640.

11. Hammoud S. S., Nix D. A., Hammoud A. O., Gibson M., Cairns B. R. And Carrell D. T. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. Human Reproduction, 2011:26, 2558–69.

12. O'Brian KL, Varghese AC, Agarwal A.'' The genetic causes of male factor infertility:'' a review. Fertil Steril. 2010;93(1):1-12.

13. Dada R., Kumar M., Jesudasan R., Fernandez J. L., Gosalvez J. And Agarwal, A. Epigenetics and its role in male infertility. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2012: 29, 213–223.

14. Gannon J. R., Emery B. R., Jenkins T. G., Carrell D. T. The sperm epigenome: implications for the embryo. Advanced Experiments in Medical Biology, 2014: 791, 53–66.

15. Khazamipour N., Noruzinia M., Fatehmanesh P., Keyhanee M. and Pujol P. MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. Human Reproduction, 2009: 24(9), 2361–2364.

16. Dhillon VS, Shahid M and Husain SA '' Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men.'' Mol. Hum. Reprod. 2007:13: 213-222.

17. Riggs A. D., Martienssen R. A. and Russo V. E. A. In Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, giriş. 1996

18. Dwi A. Suryandari, Yurnadi, Budi Wiweko, Luluk Yunaini 'Genotype distribution of methylenetetrahydrofolate reductase A1298C and C677T gene in Indonesian infertile men' Department of Medical Biology, Faculty of Medicine ,Universitas Indonesia, Jakarta, IndonesiaVol February 2012: 21, No. 1,.

19. Mahmoud Aarabi, Maria C. San Gabriel, Donovan Chan, Nathalie A. Behan, Maxime Caron, Tomi Pastine, Guillaume Bourque, Amanda J. MacFarlane, Armand Zini, '' High dose folic acid supplementation alters the human sperm methylome and is influenced by the MTHFR C677T polymorphism''Human Molecular Genetics, 2015: Vol. 24, No. 22 63016313

20. Nadir K., Filiz Ö., M.E.Yıldırım,Ö. Özdemir, Metilentetrahidrofolat Redüktaz (Mthfr) C677t ve A1298c Gen Polimorfizmleri, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2009: 16 (3) 157-161.

21. Y. Yang, Y.Y. Luo, S. Wu, Y.D. Tang, X.D. Rao, et al. Association between C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene and risk of male infertility: a meta-analysisGenet.'' Mol. Res. 15 (2): gmr.15027631 Received September 11, 2015

22. Poongotha J, Gopenath T.S, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore Med J; 2009: 50(4): 336.

23. Hamada A, Esteves S.C, Agarwal, A. The Role of Contemporary Andrology in Unraveling the Mystery of Unexplained Male Infertility. The Open Reproductive Science Journal, 2011: 3, 27-41.

24. Jones H.W, Toner J.P. (1993). The infertile couple. N Eng J Med. 1993; 29: 710-15.

25. Abıd S, Maıtra A, Meherjı P, Patel Z, Kadam S, Shah, J. Clinical and laboratory evaluation of idiopathic male infertility in a secondary referral center in India. J Clin Lab Anal; 2008: 22(1):29-38.

26. Irvıne DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. Human Reproduction, Volume 1998: 13 Supplement 1.

27. Mahanta R, Gogoi A, Roy A, Bhattacharyya I.K, Sharma P. Prevalence of azoospermia factor (AZF) deletions in idiopathic infertile males in North-East India. Int J Hum Genet; 2011: 11(2):99-104.

28. Hammoud S. S., Nix D. A., Zhang H., Purwar J., Carrell D. T. ve Cairns B. R. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. Nature, 2009:460, 473–78.

29. Crider, K.S., Zhu, J.H., Hao, L., Yang, Q.H., Yang, et al. MTHFR 677C->T genotype is associated with folate and homocysteine concentrations in a large, population-based, double-blind trial of folic acid supplementation.'' Am. J. Clin.Nutr., 93, 1365–1372(2011).

30. Carrell D. T. ve Hammoud S. S. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. Molecular Human Reproduction, 2010:16, 37–47.

31. Chen Z., Karaplis A. C., Ackerman S. L., et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. Human Molecular Genetics, 2001:10(5), 433-443.

32. Safarinejad M. R., Shafiei N. and Safarinejad S. Relationship between genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (C677T, A1298C, and G1793A) as risk factors for idiopathic male infertility. Reproductive Sciences, 2011:18(3), 304-315.

33. Ozmen F, Ozmen MM, Ozalp N et al. The prevalence of factorV (G1691A), MTHFR (C677T) and PT (G20210A) gene mutations in arterial thrombosis. Ulus Travma Acil Cerrahi 2009;15(2):113-9.

34. S.Li, J. Li, Z. Xiao2, A.-G. Ren3 and L. Jin '' Prospective study of MTHFR genetic polymorphisms as a possible etiology of male infertility''Genet. Mol. Res. 2014: 13 (3): 6367-6374.

35. Björndahl L. (). What is normal semen quality? On the use and abuse of reference limits for the interpretation of semen analysis results. Human Fertility, 2011:14(3), 179–186.

36. Wu W., Shen O., Qin Y., Niu X., Lu C., Xia Y., Song L., Wang S. And Wang, X. Idiopathic Male Infertility Is Strongly Associated with Aberrant Promoter Methylation of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR). PLOS One, 2010: 5(11), e13884.

37. Templeton A, Fraser C, Thompson, B. The epidemiology of infertility in Aberdeen. Br. Med. J., 1990: 301, 148-152.

38. Hirsch M.B, Mosher W.D. Characteristics of infertile women in the United States and their use of infertility services. Fertil. Steril., 1987:47, 618-625.

39. Irvın DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. Human Reproduction, Volume 8 Supplement 2001:1.

40. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferıal M.L., Ducot B, Lansac, J et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions. Hum Reprod; 1991:6(6):811-16.

41. Mclachlan R.I, Mallıdıs C, Ma K, Bhasn S, De kretser, D.M. Genetic disorders and spermatogenesis. Reprod Fertil Dev; 1998: 10:97-104.

42. Dohle G.R, Veeze H.J, Overbeek S.E. et al. The complex relationships between cystic fibrosis and congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical, electrophysiological and genetic data. Hum Reprod; 1999: 14:371-4.

43. Esteves S.C, Agarwal A. Novel Concepts in Male Infertility, Int Braz J Urol; 2011: 37: 5-15.

44. Vogt P.H, Edelmann A, Kırsch S., et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. Hum Mol Genet; 1996:5:933-43.

45. Shefı S. Turek P.J. Definition and current evaluation of subfertile men. Int Braz J Urol; 2006: 32: 385-97.

46. Reppini S, Kaletsky H, Lange J, Sılbe, S., Van Der Veen F, et. al. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chro-mosome causes massive deletions and spermatogenic failure. Am J Hum Genet; 2002:71: 906-22.

47. Edwards R.G, Bıshop C.E. On the origin and frequency of Y chromosome deletions responsible for male infertility. Mol Hum Reprod; 1997: 3:549-54.

48. Saut N, Terriou P, Navarro A, Levy N, Mitchell, M.J. The human Y chromosome genes BPY2, CDY1 and DAZ are not essential for sustained fertility. Mol Hum Reprod; 2000: 6: 789-93.

49. Elzanaty S. Non-obstructive azoospermia and clinical varicocele:therapeutic options. Int Urol Nephrol, 2013: 45:669–67.

50. Jarvı K, Lo K, Fische, A, Grantmyre, J, Zını A, Chow V, Mak V. CUA Guideline: The workup of azoospermic males. Can Urol Assoc J; 2010: 4(3):163-7.

51. Jarow J.P, Espeland M.A, Lıpshultz L.I. Evaluation of the azoospermic patient. J Urol, 1989: 142:62–65.

52. Diez-Sanchez C, Ruiz-Pesını E, Lapena A.C., et al. Mitochondrial DNA content of human spermatozoa. Biol Reprod; 2003: 68:180-5.

53. Sıngh K, Sıngh S.K, Sah R, Sıngh I, Raman R. Mutation C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with male infertility in an Indian population. Int J Androl; 2005: 28:115-9.

54. Mann MRW, Bartolomei MS. Epigenetic reprogramming by maternal behaviour and pharmalogical intervention nature versus nurture; let's the whole thing off. Epigenetics 2007; 2:22-8.

55. Grewal SI, Rice JC. Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs. Curr Ooin Cell Biol. 2004; 16:230-238.

56. Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. Science. 2001;292(5514):110-113.

57. Bird A. Il2 transcription unleashed by active DNA demethylation. Nat Immunol. 2003; 4:208-9.

58. Homberger G, Linnebank M, Winter C, et al. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. 2000;Eur J Hum Genet, 8:725-729.

59. Costello JF, Plass C. Methylation matters. Med Genet. 2001; 38;285-303.

60. Izmirli M, Alptekin D, Topcuoğlu MS, Güzel AI. Investigation of Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in coronary by-passed patients due to coronary atherosclerosis etiology. Turkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci.2009; 21:303-8.

61. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. Adv Cancer Res. 1998; 72:141-96.

62. Rosenblatt DS. Methylenetetrahydrofolate reductase. Clin Invest Med, 2001;24:56-59.

63. Bagley PJ, Jacob S. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. Med Sci, 1998;95:13217-13220.

64. Bailey LB, Duhaney RL, Maneval DR, et al. Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. J Nutr, 2002;132:24665-24709.

65. Kim Y. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: A paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. Nutr Rev, 2000;58:205-217.

66. Weisberg I, Tran P, Christensen B, et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. Mol Genet Metab, 1998;64: 169-172.

67. Daly SF, Molloy AM, Mills JL, et al. The influence of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on enzyme activity in placental tissue. Brit J Obstet Gynaec, 1999;106:1214-1218.

68. Stern LL, Bagley PJ, Rosenberg IH, et al. Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate- adequate persons homozygous for the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. J Nutr, 2000;130: 2238-2242.

69. Goyette P, Pai A, Milos R, et al. Gene structure of human Mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Mammalian Genome, 1998; 9:652-656.

70. Rady PL, Tyring SK, Hundnall SD, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): The incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. Am J Med Genet, 1999; 86:380-384.

71. Virich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, et al. Lack of association between the C677T MTHFR polymorphism and colorectal hyperplastic polyps. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2000; 9: 427-433

72. Goyette P, Rozen R. The thermolabile variant 677CT can further reduce activity when expressed in cis with severe mutations for human methylenetetrahydrofolate reductase. Hum Mutat, 2000;16:132-138.

73. Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, et al. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: Effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. Clin Chem, 2001; 46:1065-1071.

74. Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase in vascular dısease, neural tube defects and colon cancer. IV.Reunion, Metiyonin metabolism, molecular mechanisms and clinical implications.1998; Index no 6, March 1-5, University of Nevarra and Granada, Spain. http://www.boehringer-ingelheim.es/workshopmethionina/ anglesa/ cap6.htm.(erişim tarihi 16.01.2018)

75. Sibani S, Christensen B, O'ferrall E, et al. Charactrization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patiens with homocystinuria. Hum Mutat, 2000;15: 280-287.

76. Peng F, Labelle LA, Rainey B, et al. Single nucleotide polymorpisms ın the methylenetetrahydrofolate reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American populations. Int J Mol Med, 2001;8: 509-511.

77. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: Am J Epidemiol, 2000; 151: 862-77.

78. Nussbaum RL, Mclnnes RR, Willard HF, Boerkoel III CF, Thompson and Thompson Tıbbi genetik. Günes Kitabevi 2005 (6.baskı), 313-330

79. Eicholzer M, Luthy Z, Moser V, Fowler B. Folate and the risk of colorectal, breast and cervix cancer: the epidemiological evidence. Swiss Med Wkly 2001; 131: 539-549

80. Sharp L, Little J. Polymorphism in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia:A HuGE Review Am J Epidemiol 2004; 159: 423-443

81. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Loppert M. Methylenetetrahydofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. Cancer Epidemiol biomarkers and prevention 1999; 8: 513-518

82. Refsum H. Total Homocysteine: Guidelines for determination in the clinical laboratory. Clinical Laboratory News 2002; May: 12-14

83. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassman G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. J Nephrol, 2000;13(1):20-33.

84. Song C, Xing D, Tan W, Wel Q, Lin D, Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a chinese population. Cancer Reasearch 2001; 61: 3272-3275

85. Gayette P, Par A, Milas R, Frasst P, Tran P, et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Mammolian genome 1998; 9: 652-656

86. Carmet R, Gren R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on cobalamin, folate and hemocysteine. Am Society of Hem 2003; 62-81

87. Van der Put NMJ, Gabreels F, Stevens EMB, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?. Amer J Hum Genet 1998; 62: 1044-1051

88. Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brady LC, Banerjee R, et al. Clonning mapping, and RNA analysis of the human methionine synthase gene. Hum Molec Genet 1996; 5: 1851-1858

89. Ma J, Stampfern MJ, Christensen B, Giocannucci E, Hunter DJ et al. Polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, Homocyst(e)ine and colorectal cancer risk. Cancer Epidemiol Bio Pre 1999; 8: 825-829

90. Blount BC, Ames BN. DNA damage in folate deficiency. Bailtieres Clin Haemetol 1995;8: 461-478

91. Leclere D, Campeau F, Gayette P, Adjalla CE, Christensen B, et al. Human methionine synthase: cDNA claning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate / cobolamin disorders. Hum Mol. Genet 1996; 5: 1967-1974

92. Narin F.Tavsanlarda hiperhomosisteineminin ateroskleroz üzerine etkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Saglık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2001.

93. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassman G.nMolecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. J Nephrol, 2000;13(1):20-33.

94. Kim Y. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: A paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. Nutr Rev, 2000; 58:205-217.

95. Peng F, Labelle LA, Rainey B, et al. Single nucleotide polymorpisms ın the methylenetetrahydrofolate reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American populations. Int J Mol Med, 2001;8: 509-511.

96. Sibani S, Christensen B, O'ferrall E, et al. Charactrization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patiens with homocystinuria. Hum Mutat, 2000;15: 280-287.

97. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: Am J Epidemiol, 2000; 151: 862-77.

98. Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EMB, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for neural-tube defects. Am J Hum Genet, 1998;62:1044-1051. control study. Lancet,2001;358:1935-40

99. Lievers KJA, Boers GHJ, Verhoef V, et al. A second common variant in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and ıts relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine and cardiovascular disease risk. Journal of Molecular Medicine Received, 1 February 2001, Published online 5 July, 2001.

100. Russel P. J. IGenetics: A Molecular Approach, Second Ed., Pearson, 2006: p.606.

101. Klug W. S. Cummings M. R., Genetik Kavramlar, Öner C., Palme Yayıncılık, Ankara, 2003: p.28, 635,643.

102. Turner P. C. McLennan A. G., Bates A.D., White M. R. H., Moleküler Biyoloji: Önemli Notlar, 2. Baskıdan Çeviri, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2004:p.302, 462.

103. Yıldırım A., Bardakçı F., Karataş M., Tanyolaç T., Moleküler Biyoloji: Protein Sentezi ve Yıkımı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2007: p.300.

104. Temizkan G., Arda N., Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul: 2008.

105. http://www.landcareresearch.co.nz/research/biocons/genetics/images/ PCR9700.jpg (25.07.17).

106. http://www.mun.ca/biology/scarr/PCR_sketch_3.gif (25.07.17).

107.http://wpcontent.answers.com/wikipedia/commons/thumb/a/a6/Gel_electrophoresis _apparatus.JPG/288px- (25.07.17).

108.Gel_electrophoresis_apparatus.JPGhttp://www.biologyreference.com/images/biol_ 02_img0140.jpg (25.07.17).

109. Irfan M., Ismail M.,Azhar Beg M., Shabbir A., Rashid Kayani A., Kaukab Raja G. Assocıatıon of the mthfr c677t (rs1801133) polymorphısm wıth ıdıopathıc male ınfertılıty ın a local pakıstanı populatıon DOI: 10.1515/bjmg-2016-0007

110. Kelly TL, Neaga OR, Schwahn BC, Rozen R, et al. (2005). Infertility in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-deficient male mice is partially alleviated by lifetime dietary betaine supplementation. Biol. Reprod. 72: 667 677. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.104.035238

111. Vardarlı A. T, Bozok Cetintas V, Eroglu Z, Semerci B, Ulukus M, Tavmergen E. Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Izmir, Turkey Received .20.01.2014

112. Nussbaum RL, Mclnnes RR, Willard HF, Boerkoel III CF, Thompson and Thompson Tıbbi genetik. Günes Kitabevi 2005 (6.baskı), 313-330

113. Song C, Xing D, Tan W, Wel Q, Lin D, Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a chinese population. Cancer Reasearch 2001; 61: 3272-3275

114. Sharp L, Little J. Polymorphism in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia:A HuGE Review Am J Epidemiol 2004; 159: 423-443

115. Virich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, et al. Lack of association between the C677T MTHFR polymorphism and colorectal hyperplastic polyps. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2000; 9: 427-433

116. Eloualid A, Abidi O, Charif M, El Houate B, et al. (). Association of the MTHFR A1298C variant with unexplained severe male infertility. PLoS One 2012: 7: e34111. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.003411161

İnfertil Erkeklerde Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) C677T ve A1298G Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması

ORIGINALITY REPORT

23%	20%	7%	%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	acikerisim.kirklareli.edu.tr:8080 Internet Source	7%
2	www.researchgate.net Internet Source	4%
3	acikerisim.dicle.edu.tr Internet Source	4%
4	TAŞÇIOĞLU, Nazife, TAHERİ, Serpil, SAATÇİ, Çetin and ÖZKUL, Yusuf. "Gastrointestinal sistem kanserlerinde metilenterahidrofolat redüktaz geni 677C -- t polimorfizminin incelenmesi", Fırat Üniversitesi, 2006. Publication	3%
5	student.aku.edu.tr Internet Source	1%
6	library.cu.edu.tr Internet Source	1%
7	www.hedilife.com Internet Source	<1%

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Atıf KOÇER

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 20 Mart 1988
KAYSERİ Medeni Durumu: Bekâr

Tel: +90 0545 778 74 77

Yazışma Adresi: Düzencik Mahallesi/
Sarıoğlan/ KAYSERİ

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	C.Ü.Mol.Biy. ve Genetik, SİVAS	2011
Lise	Fevzi Çakmak Lisesi, KAYSERİ	2005

YABANCI DİL

İngilizce