



**AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTEDE SPERM EPİGENETİK
DEĞİŞİKLİKLERİ**

Müjdegül ZAYIFOĞLU KARACA

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MAYIS 2016

Müjdegül Zayıfoğlu Karaca tarafından hazırlanan "Açıklanamayan infertilitede sperm epigenetik değişiklikleri" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ece KONAÇ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Başkan : Prof. Dr. Cenk Y. BİLEN

Üroloji, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Prof. Dr. Üstünol KARAOĞLAN

Üroloji, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Prof. Dr. Belgin ATAÇ

Tıbbi Biyoloji, Başkent Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Tez Savunma

Tarihi: 25/05/2016

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Müjdegül ZAYIFOĞLU KARACA

25.05.2016

AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTEDE SPERM EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİ
(Doktora Tezi)

Müjdegül ZAYIFOĞLU KARACA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2016

ÖZET

Epigenetik üreme tıbbında giderek daha çok araştırılan bir konudur. Erkek infertilitesi ile ilişkili bulunan pek çok epigenetik değişiklik gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı açıklanamayan infertilite nedeniyle yardımla üreme tekniği önerilen erkeklerin sperminde MTHFR gen promotoru hipermetilasyonunun idiopatik infertilite ile ilişkisi olup olmadığının incelenmesidir. Çalışma grubu olarak en az 2 yıl süreyle iyi tanımlanmış açıklanamayan infertilite tanısı olan ve Hacettepe Üniversitesi Infertilite Merkezi'ne başvuran çiftlerin erkek eşleri seçilmiştir. Kontrol grubu ise aynı yaş grubunda normal olarak çocuk sahibi olmuş normal spermiogramlı erkeklerden oluşturulmuştur. Sperm toplanmasının ardından DNA ekstraksiyonu yapılmış ve MTHFR gen promotoru için bisülfid dönüşümü ve pyrosekans analizi yapılmıştır. Çalışma ve kontrol gruplarında 40'ar olgunun bulguları analiz edilmiştir. Çalışma ve kontrol gruplarında metilasyon oranlarının ortalaması sırasıyla 10,01% (1-77) ve 4,3% (2-10) olarak tespit edilmiş ve istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.015$). ROC analizinin işaret ettiği %9,5 metilasyon oranı hipermetilasyon tayini için eşik değer olarak alındığında çalışma ve kontrol gruplarında sırasıyla 21 ve 2 hipermetile olgu tespit edildi ($p<0.001$). Çalışma grubunun grup içi analizi uyarınca hipermetile ve normal bireyler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Açıklanamayan infertilite bireysel olarak yönetilmesi gereken tartışmalı bir durumdur. Her ne kadar bu durumun asıl nedeni olarak tanı konulmamış bir endometriozis ya da anovulasyon gibi kadın kaynaklı bir durum suçlansa da erkek subfertilitesi daima akılda tutulmalıdır. Epigenetik çalışmalar infertilitenin gerçek nedenine işaret ederek yönetim seçeneklerinin gözden geçirilmesini sağlayabilir.

Bilim Kodu :101.01.00
Anahtar :Moleküler genetik
Kelimeler
Sayfa Adedi :67
Danışman :Doç. Dr. Ece KONAÇ

SPERM EPIGENETIC ALTERATIONS IN UNEXPLAINED INFERTILITY

(Ph. D. Thesis)

Müjdegül ZAYIFOĞLU KARACA

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

May 2016

ABSTRACT

Epigenetics is being increasingly more considered in reproductive medicine. Many epigenetic alterations have shown to be related with male infertility. The aim of this study is to find out if MTHFR gene promotor hypermethylation is associated or not within the sperm of men who were offered assisted reproduction with unexplained infertility indication. Men from the couples with at least 2 years long well-defined unexplained infertility who were applied to Hacettepe University Infertility Center were selected as the study group. The control group was consisted of normally conceived men with normal spermiogram who were at the same age group. Following sperm collection process, sperm DNA was extracted and bisulfite pyrosequencing was performed for detection of the MTHFR gene promotor region. There were 40 eligible men in the study and 40 in the control group as well. The medians of methylation rates were 10.01% (1-77) and 4.3% (2-10) for the study and the control groups respectively which was significantly different ($p=0.015$) between two groups. Taking 9.5% of methylation level into account as a threshold which was determined via ROC analysis there were 21 and 2 hypermethylated men in study and control groups respectively ($p<0.001$). Regarding the intragroup analysis of the study group there were no statistically significant differences between hyper- and normo-methylated men. Unexplained infertility is a controversial condition which has to be managed individually. Although it was concluded that undiagnosed endometriosis or ovulation problem could be the case for these couples male subfertility should be borne in mind. Epigenetic studies would reveal the real causes of infertility and may affect the management options.

Science :101.01.00

Code

Key Words :Molecular genetics

Page :67

Number

Advisor :Assoc. Prof. Dr. Ece KONAC

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca engin bilgisi ve samimiyetiyle daima desteğini benden esirgemeyen, değerli danışmanım Doç. Dr. Ece KONAÇ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca eğitimim süresince beni bu sıcak bilimsel yuvada misafir eden bütün hocalarıma, öğrenci arkadaşlarıma ve personele çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın projelendirilmesi aşamasında kıymetli katkılarda bulunan; ancak elim bir trafik kazasında kaybettiğimiz “Hacettepe Üniversitesi” Üroloji Bölümü'nden merhum Doç. Dr. Kubilay İNCİ'ye aziz hatırası önünde şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Çalışmayı birlikte gerçekleştirdiğimiz “Hacettepe Üniversitesi” öğretim görevlileri Prof. Dr. Cenk Y. BİLEN, Doç. Dr. Gürkan BOZDAĞ ve Buket YURTERİ'ne teşekkür ederim.

Beni bu meşakkatli yolda yalnız bırakmayan sevgili arkadaşlarım Nuray VAROL ve İlker KILIÇCIOĞLU'na da ayrıca teşekkür ederim.

Örneklerin toplanmasında yeri doldurulamaz emeği bulunan, özverili çalışan “Hacettepe Üniversitesi” Androloji laboratuvarı teknisyeni sayın Yaşar TEKİN'e gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Hem eğitimim hem de tez yazımı sırasında daima yanımda olan değerli eşim Kutay KARACA, annem Sibel KARACA ve bütün aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma Gazi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında 01/ 2014-05 proje kod numarası ile desteklenerek yapılmıştır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Epigenetik	3
2.1.1. DNA metilasyonu.....	4
2.1.2. Histon modifikasyonu	5
2.1.2. Kromatin düzenlenmesi	7
2.2. Spermin gametogenez süreci.....	11
2.2.1. Spermin epigenetiği.....	13
2.2.2. Spermin protaminasyonu.....	14
2.2.3. Histon metilasyonu ve histon modifikasyonu.....	16
2.2.4. Sperme özgü histon varyantları.....	17
2.2.5. Sperm imprinti	18
2.3. Diğer epigenetik mekanizmalar	19
2.3.1. Mikro RNA'lar	19
2.4. MTHFR geni	20
2.5. DNA metilasyon tayini	21

2.6. DNA dizi analizi / sekanslama	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Örneklerin toplanması ve sperm değerlendirilmesi	25
3.1.1. Örneklerin toplanması	25
3.1.2. Sperm değerlendirilmesi	27
3.2. Kullanılan cihazlar	27
3.3. Kullanılan sarf malzemeler	28
3.4. Kullanılan kimyasallar	28
3.5. Kullanılan kitler	29
3.6. Yöntemler	29
3.6.1. DNA izolasyonu	29
3.6.2. Bisülfid dönüşümü	31
3.6.3. Pyrosekans	33
3.7. İstatistiksel analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1. Demografik veriler ve metilasyon düzeyleri	39
4.2. Grup için analiz	42
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	51

	Sayfa
EKLER.....	61
EK-1.Gönüllü bilgi formu.....	62
EK-2.Etik olur formu	63
ÖZGEÇMİŞ.....	65

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Epigenetik değişikliklere yol açan genler/proteinler listesi.....	8
Çizelge 2.2. Erkek infertilitesi ile ilişkisi olduğu gösterilen genler/proteinler.....	14
Çizelge 3.1. Bisülfid dönüşümü için gerekli döngü.....	32
Çizelge 3.2. PyroPCR için gerekli döngü.....	35
Çizelge 4.1. Grupların demografik veri ve sonuçlarının özeti	39
Çizelge 4.2. Grup içi analiz özeti.....	42

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Sitozin metilasyonu	4
Şekil 2.2. Epigenetik olaylar özeti	9
Şekil 2.3. Nükleusta matriks ve genomun üç boyutlu şeması	10
Şekil 2.4. Sperm nükleusunda matriks ve genomun üç boyutlu şeması	11
Şekil 2.5. Gametogenez	12
Şekil 2.6. Spermde özellikli temel epigenetik değişiklikler	17
Şekil 2.7. Metil siklusu ve MTHFR enzimi.....	19
Şekil 3.1. QIAamp mini kit ile DNA izolasyonu	30
Şekil 3.2. Spektrofotometrik DNA miktarı tayini	31
Şekil 3.3. Metile olmayan sitozinin urasile deaminasyonu	32
Şekil 3.4. MTHFR ve CLCN6 geni	34
Şekil 3.5. Pyro sekans cihazı çalışma prensibi.....	36
Şekil 3.6. Pyrosekans dizi analiz cihazı	37
Şekil 3.7. Pyrosekans cihazı kartuşu	37
Şekil 3.8. Pyrosekans ekran çıktısı.....	38
Şekil 4.1. ROC analiz eğrisi	41

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
M	:Molar
μM	:Mikromolar
nM	:Nanomolar
mM	:Milimolar
μg	:Mikrogram
gr	:Gram
μl	:Mikrolitre
ml	:Mililitre
cm²	:Santimetrekare
°C	:Santigrat
pmol	:Pikomol
U	:Unite
dk	:Dakika
%	:Yüzde
V	:Volt
mA	:Miliamper

Kısaltmalar	Açıklamalar
A	:Adenin
Ac	:Asetil
AE Tampon	:DNA elüsyon tamponu
AL Tampon	:Hücre lizis tamponu
ATP	:Adenozin trifosfat
AW Tampon	:Yıkama tamponu

Kısaltmalar**Açıklamalar**

BD Tampon	:Bisülfid DNA denatürasyon tamponu
BL Tampon	:Bisülfid lizis tamponu
BORIS	:Brother of the regulator of imprint sites
BRDT	: Bromodomain testis-specifik protein
BW Tampon	:Bisülfid yıkama tamponu
C	:Sitozin
CTCF	: CCCTC-binding factor
Ch1	:1. kromozom
COBRA	:Kombine bisülfid restriksiyon analizi
DNA	:Deoksiribonükleik asit
dNTP	:Deoksiribonükleotidtrifosfat
DNMT	:DNA metil transferaz
EDTA	:Etilendiamin tetraasetik asit
EB tampon	:Elüsyon tamponu
E-vit	:E vitamini
G	:Guanin
GTL2	:Maternal eksprese gen trap lokus
HATs	:Histon asetiltransferazlar
HDACs	:Histon deasetiltransferazlar
HDM	:Histon demetilaz geni
HMT	:Histon metil transferaz
HRAS	:İnsan viral sarkoma onkogeni
IGF2	:İnsülin benzeri büyüme faktörü
ISWI	:İmitation SWI kromatin remodelling geni
MEST	:Mesoderm Specific Transcript geni
mRNA	:Haberci RNA
MTHFR	:Metilen tetrahidrofolat redüktaz
MTHFR-CLCN	:MTHFR Klor kanalı geni
PCR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
MYST	:Histon asetil transferaz gen ailesi
Prm	:Protamin

Kısaltmalar**Açıklamalar**

Ppi	:Pirofosfat
ROC	:Receiver operations characteristics
Rpm	:Dakikadaki döngü sayısı
SAH	:S-adenozil Homosistein
SAM	:S-adenozil Metiyonin
RNA	:Ribonükleik asit
SIRT1	:Sitrüllin geni
SNRPN	:Small nuclear ribonucleo polipeptit N
T	:Timin
THF	:Tetrahidrofolat
TP	:Tranzisyon proteini
Wnt	:Wingless transkripsiyon sinyal proteini
X2	:Yıkama solusyonu
YÜT	:Yardımcı üreme teknikleri

1. GİRİŞ

İnfertilite, çiftlerin korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebelik elde edememesi durumudur. Çiftlerin en az %15'ini etkileyen infertilite; yaklaşık %30 kadın, %30 erkek kaynaklı olarak karşımıza çıkmaktadır [1]. Bütün infertilite olgularının yaklaşık %25'inde ise gösterilebilir bir neden bulunamaz ve bu duruma “açıklanamayan infertilite” denir [2-4].

Açıklanamayan infertilite tanısı konan çiftlerin en az yarısında erkeğe ait bulunamamış bir neden olduğu düşünülebilir. Bu durumu erkek subfertilitesi olarak adlandırmak yerinde olacaktır [5].

Erkek fertilitesi oldukça karmaşık bir kavramdır. Söz konusu erkek subfertilitesi olduğunda, sperm sayı ve morfolojisi göz önünde bulundurularak yapılan, standart değerlendirme yetersiz kalmaktadır [6]. Bugün başarılı bir gebelik elde etmek için, normal bir spermiogramdan fazlasına ihtiyaç olduğunu gösteren bilimsel kanıtlar mevcuttur [7-11]. Spermatogenez ve fertilizasyonda görev alan binlerce gen bulunmaktadır. Bu genlerle ilgili en küçük bir anomali bile sperm kalitesinde ciddi bozulmalara neden olmaktadır [12]. Yine de sperm kalitesi bozulmadan sperm fonksiyonunun bozuk olduğu durumlar bulunmaktadır. Spermin fonksiyonu; taşıdığı genetik koda olduğu kadar, bu bilginin ifadenmesine de bağlıdır. Epigenetik bu konuyla ilgili giderek daha fazla çalışılan bir alandır.

Epigenetik değişiklikler, bir genin; DNA sekansında herhangi bir değişiklik olmaksızın; ekspresyonunu etkileyen bölgesel ve geçici değişikliklerdir. Bunlar; kromatin yapısının stabilitesi, genom bütünlüğü, doku tipine özgü gen ifadelerinin düzenlenmesi, embriyonik gelişim, genomik imprinting ve X kromozomunun inaktivasyonundan sorumludur. 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 [13].

Türe ve dokuya son derece özgü olan sperm epigenomu, hem fertilizasyon başarısı hem de erken embriyogenezde kritik bir önem taşımaktadır [8-10]. Sperm metilasyon anomalilerinin idiyomatik erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [11]. Özellikle spermde global metilasyon artışı ciddi sperm disfonksiyonuyla ilişkilendirilmiştir [14]. Spermin metilasyonu dietsel faktörlere olduğu kadar gen ifade düzeylerine de bağlıdır.

Folat metabolizmasıyla ilgili genlerdeki mutasyonlar erkek infertilitesi ile ilişkilidir [15-17]. 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. 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].

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 idiyomatik erkek infertilitesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [19-21]. Ancak çalışmalarda her ikisinin de aslında ciddi düzeyde spermiogram bozukluğuna yol açtığına işaret edilmektedir.

Bu çalışmada objektif bir şekilde gösterilebilir hiç bir sperm parametre bozukluğu bulunmayan ama; inatçı bir şekilde infertil olan erkeklerin spermlerinde, spontan gebelik elde edebilmiş sağlıklı bireylere kıyasla, *MTHFR* geni promotorunda metilasyon değişikliği olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

İnfertiliteye yaklaşımda, genellikle kadına yönelik faktörler ön planda sorgulanmakla birlikte erkeğe ait nedenlerin hiç de yok sayılamayacak kadar fazla etkisi vardır. Tüm infertilite olgularının yarısında tek başına ya da kombine olarak erkek kaynaklı faktörlerin rol oynadığı bilinmektedir [22]. Erkek infertilitesi varikosel, anatomik ve genetik bozukluklar ile oksidatif stres ve kötü yaşam tarzı alışkanlıkları gibi bir çok çeşitli nedene bağlıdır.

Erkek infertilitesi; sadece genetik değil, epigenetik faktörlerin de rol oynadığı kompleks bir sorundur. Genetik bozukluklar ve kromozom kırıklarının sperm anormalliklerine yok açtığı bilinen bir gerçektir. Ancak mevcut çalışmalar erkek infertilite olgularının ancak %15'inde genetik bir neden ortaya koyabilmiştir [23].

Sperm sayısı, şekil ve hareket bozukluklarının epigenetik değişimlerle korele olduğunun tespiti ile, sperm epigenetiği üzerinde büyük bir bilimsel ilgi toplanmıştır [12]. Son yıllarda erkek nedenli infertilite konusunda bir çok çalışma yapılmıştır. Artık epigenetik değişimlerin sperm anomalisine neden olarak erkek infertilitesine yol açtığıyla ilgili yeterli düzeyde kanıt vardır. Spermde tespit edilebilir düzeyde sayı, şekil ve hareket bozukluğu olmadan, infertilite ya da subfertilite görülmesinin de epigenetik değişimlerle korelasyon göstermesi dikkat çekicidir.

2.1. Epigenetik

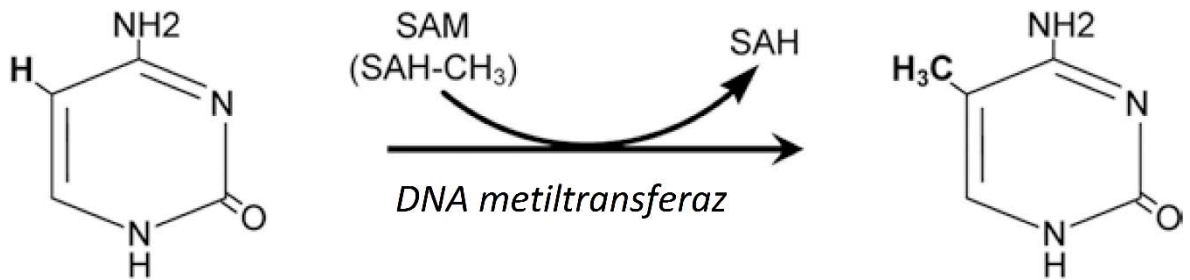
DNA sekansının kendisinin değişmeden gen ifadesinin düzenlendiği ve fenotipe yansıyan tüm kalıtsal bilgiler epigenetik olarak değerlendirilir. Epigenetik regülasyon oldukça türe özgüdür ve insan epigenetiğinin hayvan modellerine bakılarak tahmin edilmesi her zaman mümkün olmaz. Ancak hayvan deneyleri de oldukça katkı sağlamaktadır. Çevresel etkenlere bağlı olarak değişen epigenetik düzenlenmeler, tıpkı genetik bilginin aktarımı gibi, soya geçirilebilir. Örneğin; düşük protein içerikli diyetle beslenen farelerin yavrularında kolesterol ve lipid sentezi ile ilgili genlerde ifade artışına neden olan epigenetik düzenlenmelerin olduğu gösterilmiştir [24].

Temel mekanizmalar aynı olsa da epigenetik modifikasyonlar her türde farklı ifade bulmaktadır. DNA ve histon yapısında kovalent ya da nonkovalent değişimler epigenetik bilgiyi oluşturmaktadır. Epigenetik kod erken embriyo gelişimi döneminde yazılır. Ancak; organ ve dokuya özgü geçici ya da kalıcı değişimler olabilir. Genetik bilginin canlının hayatı boyunca sabit olmasının yanı sıra epigenetik bilgi dinamiktir [13].

Epigenetik mekanizmalar temel olarak; 1) DNA metilasyonu, 2) Histon modifikasyonu ve 3) Kromozom yeniden düzenlenmesi olarak sayılabilir. Ayrıca kodlayıcı olmayan RNA'lar gibi transkripsiyon ürünleri de bu düzenlemede görev alabilir. En önemli epigenetik mekanizma DNA metilasyonudur [13].

2.1.1. DNA metilasyonu

DNA'nın metilasyonu, genomdaki Sitozin (C) primidininin 5' pozisyonuna metil grubunun eklenmesidir (şekil 2.1). Özellikle CpG (Sitozin-fosfat-Guanin) adalarındaki C metillenir ancak; genomun diğer bölgelerinde de (nonCpG alanlar) metilasyon görülebilir. CpG yazılışındaki "p" iki nükleotid arasındaki fosfat bağına işaret etmektedir. Metilasyon sıklığı bakımından yanında G nükleotidinin bulunduğu C'nin metillendiği CpG'yi sırasıyla CpA, CpT ve CpC izlemektedir [25]. CpG adaları, CG dinükleotidinin daha yüksek oranda bulunduğu (CG'nin GC'ye oranının %55'ten fazla olduğu), yaklaşık 500 baz çifti uzunluğunda gen bölgeleridir [13].



Şekil 2.1. Sitozinin metile edilerek 5-metilsitozine dönüştürülmesi. Guaninden önceki sitozin, (CpG adaları) ortamda DNA metiltransferaz ve SAM varsa 5. pozisyonundaki karbon atomundan (koyu renkle gösterilmiş) metillenir. SAM S-adenozil metiyonin, SAH S-adenozil homosistein [13]

CpG adaları; metilasyon oranı ile ifadesini değiştirmek üzere; memeli genlerinin yaklaşık %40'ının promotorunda mevcuttur [26]. Genellikle, hücrenin fonksiyonları ile ilgili genler olan, housekeeping genlerin promotorunda bulunmaktadır. Bu genlerin transkripsiyonu, dokuya özgü olacak şekilde düzenlenir. Gen promotorunda bulunan CpG adalarının yüksek oranda metile olması gen transkripsiyonunu azaltırken, metilasyonun azalması transkripsiyonun artmasına neden olur [27]. Memeli genomunda 28 milyon CpG adası vardır. Gen promotorlarında bulunan CpG adalarının %60-80'i metile durumdadır [13]. Ayrıca, perisentrik ve sentromerik heterokromatin alanlarında da yoğun miktarda hipermetile CpG adası bulunmaktadır [28].

DNA metilasyonu temel olarak DNA Metil Transferazlar (DNMT'ler) aracılığıyla yürütülür. DNMT'ler S-Adenozil Metionin'den (SAM) aldığı metil grubunu C'e aktarır ve ürün olarak S-Adenozil Homosistein (SAH) ve 5-Metil-Sitozin oluşur. Ana DNMT'ler üç tanedir: DNMT1, 3a ve 3b. DNMT1 mevcut metilasyon paterninin her mitozdan sonra yenilenmesinde asıl görevli enzimken, DNMT3a ve 3b erken embriyogenezde yeni (denovo) metil kalıbının yazılmasından sorumludur [29]. DNMT2'nin ise insanda RNA metilasyonu yaptığı ve DNMT3L'nin de DNMT3a2'nin aktivasyonunda görev aldığı gösterilmiştir [30,31].

DNA modifikasyonunda görev alan başka bir epigenetik aracı da 5-hidroksimetilsitozin'dir (5hmC). 5hmC, DNA'nın demetilasyonu sırasında meydana gelen bir geçiş molekülüdür. Transkripsiyon regülasyonu, metilasyon regülasyonu ve tümör gelişimi gibi çeşitli olaylarda rol oynar [32].

2.1.2. Histon modifikasyonu

Histon kodu, DNA'nın belirli bölgelerinin transkripsiyona elverişli olmasını ya da olmamasını sağlar. DNA'yı sıkı bir şekilde paketleyen histon proteinlerinin metilasyonu, asetilasyonu, fosforilasyonu, ubikuitinasyonu, ribozilasyonu ve SUMOylasyonu toplamı histon kodunu oluşturmaktadır. Modifikasyonların tamamı Histon proteinlerinin -N ucundaki aminoasitlere yapılan eklemeler ile olmaktadır [13].

Histon metilasyonu

Histon Metil Transferaz (HMTase) enzim ailesi aracılığıyla sağlanan modifikasyondur. Histon metilasyonu genellikle genin susturulması yönünde bir sonuca neden olur [33]. Metile H3K9 (H3 proteininin N ucundaki lizinin 9. pozisyonundan metilasyonu) genellikle heterokromatinde bulunan transkripsiyon yönünden inaktif gen bölgelerinin histon proteinidir. DNA'nın metilasyonu H3K9 metilasyonunu tetikleyebilir [34].

Ancak; bazen Arjinin ve Lizin metilasyonu gen aktivasyonuna yol açar. Metile H3K4 aktif gen bölgelerinde görülür. Bir de tek bir amino aside birden fazla sayıda metil grubu aktarımı görülür. Bu durumda ise özgül bir kod oluşur [34].

Histon asetilasyonu

Histon Asetil Transferaz (HAC) ve Histon DeAsetilazlar (HDAC) aracılığıyla düzenlenen histon asetilasyonu genellikle transkripsiyonun artmasına neden olur. Histona asetil grubu eklenince negatif yüklü olan DNA ile histon arasındaki çekim gücü azalır ve DNA daha gevşek hale gelir. Histon asetilasyonu sperm DNA'sının paketlenmesinde önemli bir role sahiptir. Lizin aminoasidine asetil eklenmiş histonlar bromodomain içeren proteinler olarak bilinir ve kromatin düzenlenmesinde görev alır [34].

Histon fosforilasyonu

Histon proteininin Serin rezidüsünden fosforile olması genellikle gen aktivasyonuna neden olur. Yalnızca H2Ax yayantı fosforile olduğunda gen sessizleşmesi görülür [34].

Diğer histon modifikasyonları

Lizin rezidüsünün Ubikuitin molekülüyle ya da SUMO'larla (Small Ubiquitin-like Modifier protein) kovalent bağlanması, sadece DNA'nın transkripsiyonuna aracılık

etmekle kalmaz; ayrıca diğer modifikasyonlara da rehberlik yapar. Histon ribozilasyonu ve sitrillünizasyonu da söz edilebilecek diğer modifikasyonlardır [13].

2.1.3. Kromatin düzenlenmesi

Diğer iki mekanizmanın aksine DNA'da non-kovalent olarak yapılan modifikasyonları işaret eden terimdir. ATP bağımlı olarak nükleozom şeklinin değiştirilmesi esasına dayanmaktadır. ATPaz'lar negatif süperhelikal torsiyon yaparak DNA'ya artı şeklini verir ve DNA'nın serbest rotasyonunu önler. Gen aktivasyonu ya da susturulması ile sonuçlanabilir. Basitçe histonların kaydırılması ile DNA ipliğinin açılması ya da kapatılmasıdır [13].

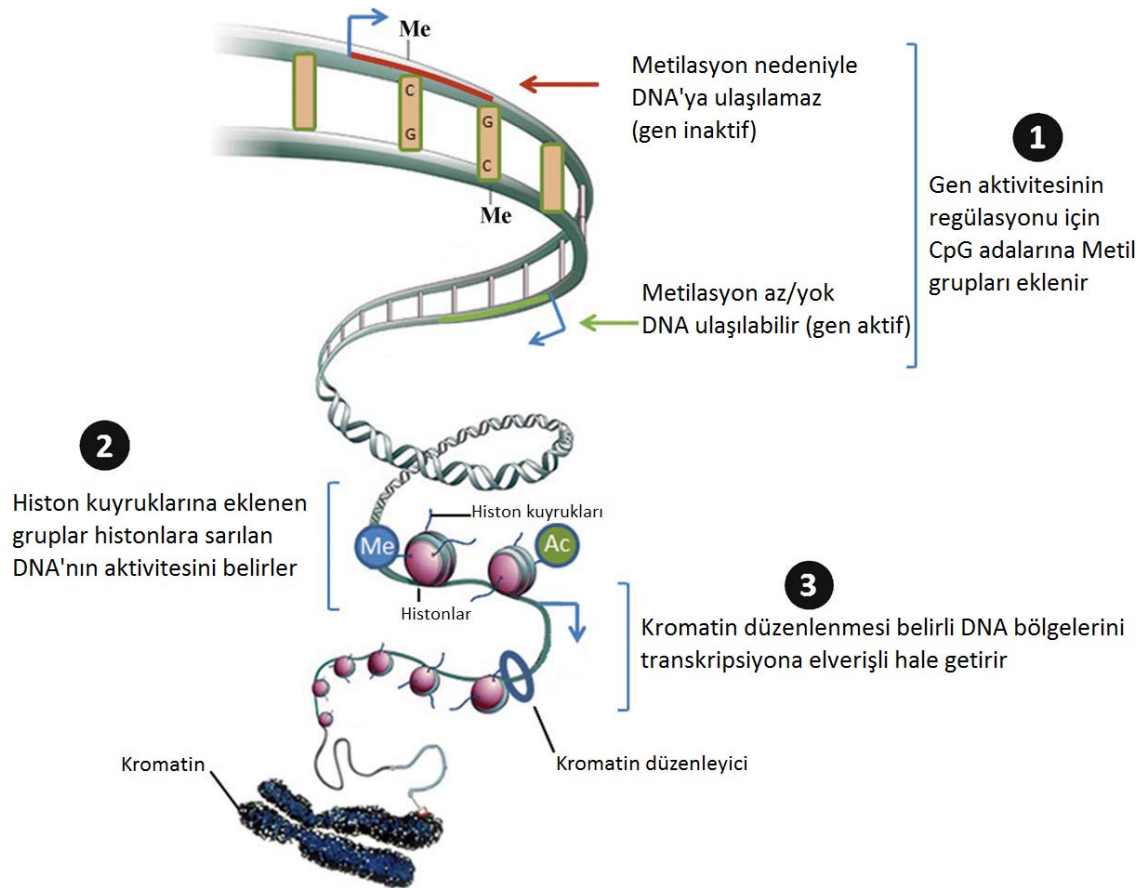
DNA ipliğinin kayarak kendi helikal eksenini dışında kıvrılmasını sağlayan mekanizma henüz net olarak aydınlatılamamıştır. Bilinmeyen bir molekül tarafından DNA'nın çekildiği ya da burkulduğu düşünülmektedir. DNA Histonlar etrafında ayrıca; dönebilir, bükülebilir ve tümsekleşebilir. DNA'nın primer sekansına bakılarak nükleozom formasyonunu tahmin etmek mümkündür. Zira, belirli tekrar dizileri DNA zincirinin belirli şekilde katlanmasına neden olur [35-38].

İnsanda görülen epigenetik düzenlenmelerle ilişkili olduğu gösterilen bazı genler ve bunların fonksiyonları çizelge 2.1'de liste şeklinde özetlenmiştir [12]. Bu genlerdeki mutasyon ya da polimorfizm gibi değişiklikler bireyin epigenetik kodunu değiştirerek fenotipik farklılık yaratabileceği gibi aynı sonucu bu genlerin kendilerinin epigenetik düzenlenmeleri de doğurabilir [34].

Çizelge 2.1. Epigenetik değişikliklere yol açan genler/proteinler listesi [12]

<i>İlgili Gen/Protein</i>	<i>Fonksiyonu</i>
<i>MTHFR</i>	Metil donorü rezervini sağlar
<i>DNMT1, DNMT3A, DNMT3B</i>	DNA metilasyonu
<i>DNMT3L</i>	DNMT3A2 aktivitesi için gerekli
<i>SWI/SNF, ISWI</i>	Kromatin düzenlenmesi
<i>Jhdm2a</i>	Kromatin düzenlenmesi
<i>Suv39h1</i>	Histon metilasyonu
<i>G9a</i>	Histon metilasyonu
<i>LSD1-içeren proteinler, JmjC-içeren proteinler</i>	Histon demetilasyonu
<i>HAT ler</i>	Histon asetilasyonu
<i>MYST</i>	Histon asetilasyonu
<i>HDAC ler</i>	Histon deasetilasyonu
<i>SIRT1</i>	Histon deasetilasyonu
<i>MUTp</i>	Histon fosforilasyonu
<i>NHK-1</i>	Histon fosforilasyonu
<i>MSK1, MSK2</i>	Histon fosforilasyonu
<i>PKA</i>	Histon fosforilasyonu
<i>HR6B</i>	Histon ubiquitinasyonu
<i>E1 SUMO-aktif edici enzim 1, E1 SUMO-aktif edici enzim 2, UBC9</i>	Histon sumoylasyonu
<i>CTCF</i>	Farklı metilasyon bölgeleriyle ilişkiye girer
<i>BORIS</i>	Demetilazlarla ilişkili

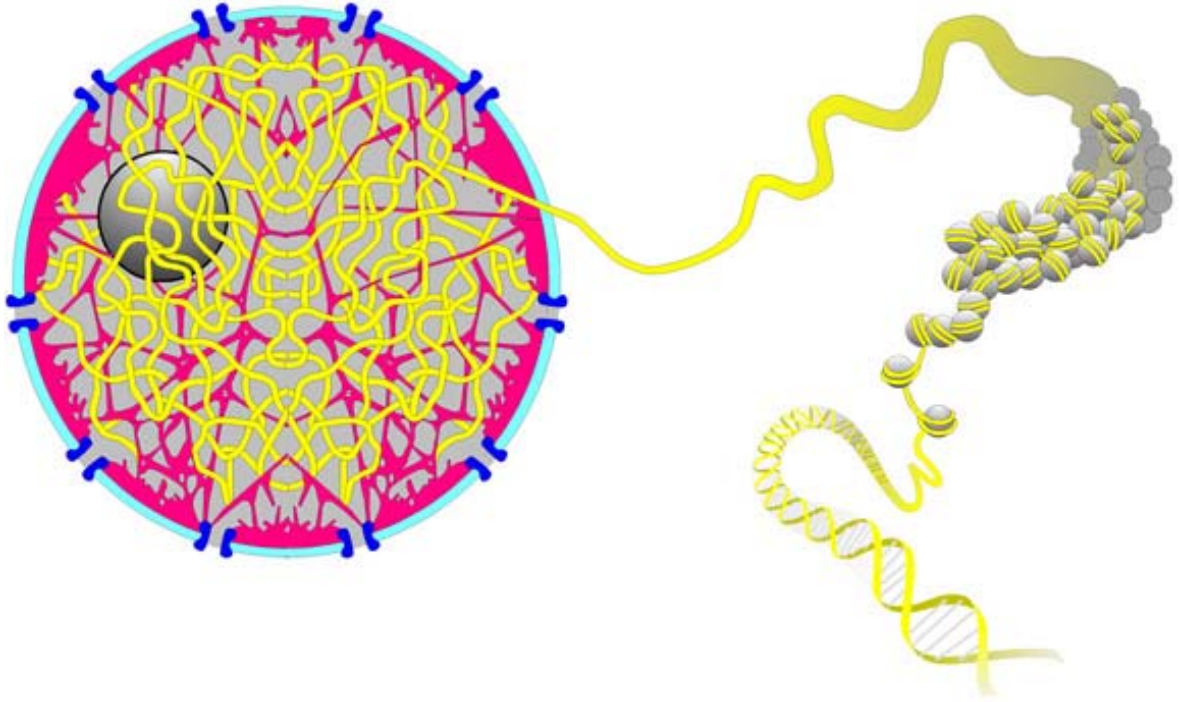
Gen regülasyonunda önemli bazı epigenetik mekanizmalar ve DNA'nın 3 boyutlu yapısı ile ilişkisi Şekil 2.2'de şematik olarak gösterilmiştir [38].



Şekil 2.2. Kromozomda meydana gelen epigenetik değişikliklerin şematik bir özeti (1) DNA metilasyonu (2) Histon modifikasyonu (3) Kromatin düzenlenmesi [38]

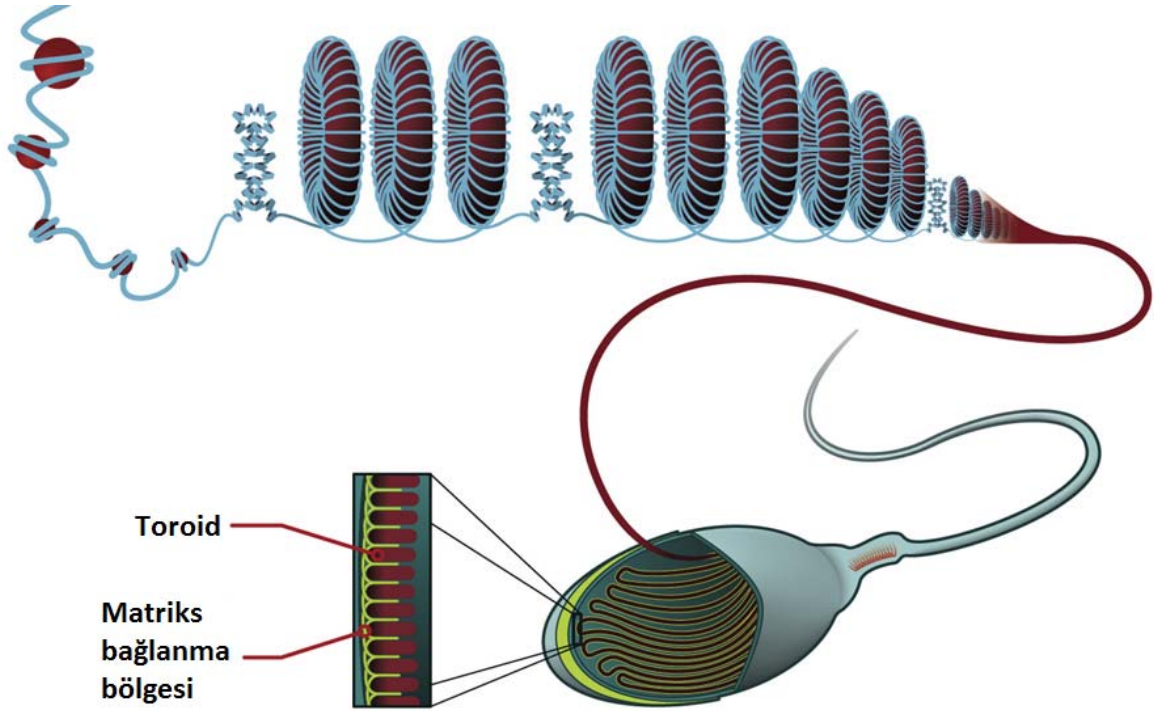
Yukarıda yer alan şekildeki eksik şematik gösterim ise kromozomun metafaz kromozomu olarak resmedilişinden kaynaklanmaktadır. Çünkü; hücre döngüsünde yalnızca bir defa gerçekleşen bölünme anında kromozomlar azami düzeyde paketlenmiş ve transkripsiyona kapatılmış durumdadır. Epigenetik değişiklikler bu aşamada yapılamaz. Ancak; bölünmeden hemen sonra oluşan kardeş hücrelerde kromatin hızlı bir şekilde yoğunluğunu kaybeder, nükleus içinde üç boyutlu formunu kazanır ve tüm epigenetik değişiklikler yeniden yapılır.

Gen ifadesi sırasında; yani hücrenin yaşam boyu gösterdiği fonksiyonlarında; oluşan olaylarla ilgili olarak, kromatinin üç boyutlu yapısını anlamak çok önemlidir. Bu yapıda nükleus matriksi ile ilişkiye giren DNA ve ilişkisi olmayan DNA kısımları genomun ifadesini belirlemektedir (Şekil 2.3) (www.biology.emory.edu). Zira; bütün hücresel olaylar matrikste gelişirken, DNA aslında yalnızca şifre bilgisini içermektedir.



Şekil 2.3. Hücre nükleusunun şematik çizimi. Nükleus matriksi kırmızı, kromatin ise sarı renkle gösterilmiştir (www.biology.emory.edu)

Kromatinin üç boyutlu yapısı spermin olgunlaşması sırasında büyük oranda korunmaktadır. Ancak uzayan spermatitte histon nükleoproteinlerinin yerini protaminler alırken nükleus matriksine bağlı olan DNA bölümleri önemli epigenetik şifrelerle donatılır. Ayrıca hacim ekonomisi yapılması için nükleer matriks özel bir şekilde düzenlenir (Şekil 2.4) [39].



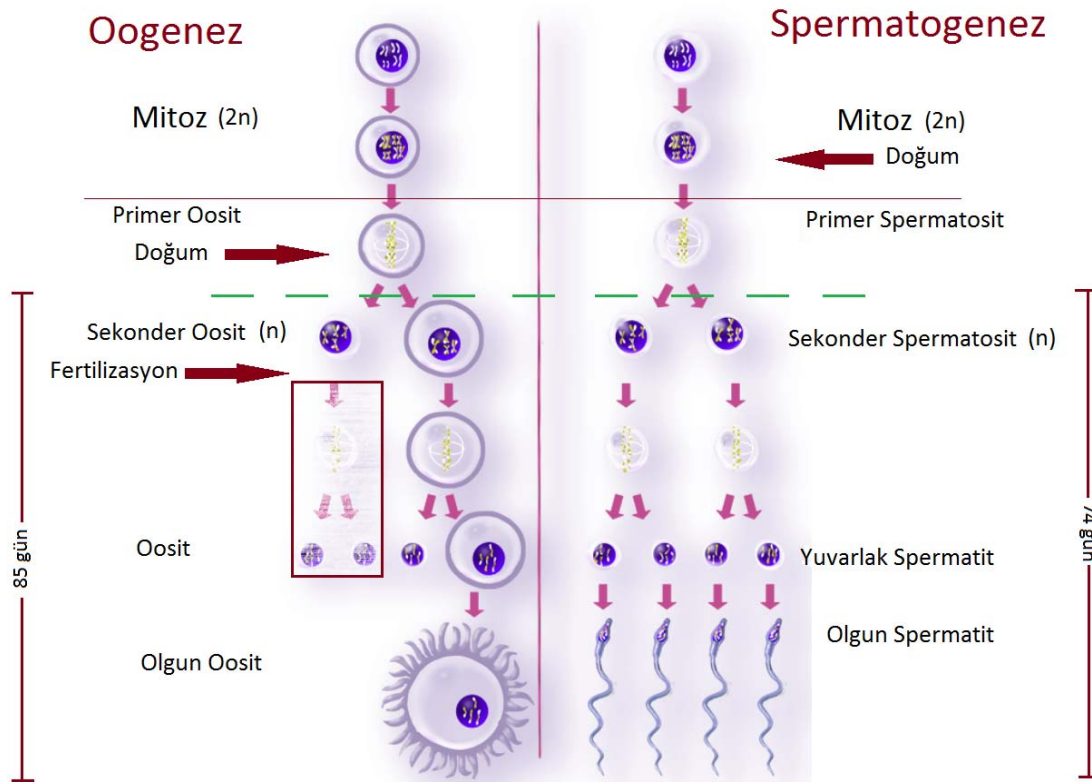
Şekil 2.4. Sperm nükleusunun şematik çizimi. Kromatin kırmızı, matriks ise yeşil ile temsil edilmiştir [39]

2.2. Spermin gametogenez süreci

Fertilizasyon sırasında paternal haploid genom protaminler tarafından sıkıca paketlenmişken; maternal haploid genom histonlara bağlı ve ikinci metafaz arestindedir. Fertilizasyonla beraber protaminler derhal histonlarla değiştirilir ve oosit ikinci metafazı tamamlayarak 2. polar cisimciği oluşturur. Paternal kromatine ait H3 ve H4 histonlar maternal kromatine kıyasla daha fazla asetile durumdadır [40,41].

Germ hücrelerinin olduğu erken embriyogenezden itibaren dişi ve erkek germ hücreleri farklı süreçlerden geçer. Erken embriyoda epiblastlardan farklı olan primordial germ hücreleri; dişide hemen mayoz bölünmeye girerek birinci profazda areste uğrarken, erkekte ise mitotik areste girer. Adolesansla beraber mitozu hızlanan spermatogoniumlar yaklaşık 74 gün süren gametogenez süreciyle olgun spermilere dönüşürler ve bu kadındaki aksine yaşam boyu devam eden bir döngüdür. Bu da bireysel beslenme, toksik etkilere maruz kalma ve oksidatif stres gibi yaşamsal faktörlerden gametlerin de daha çok etkilenmesi anlamına gelir [34].

Birinci mayoz bölünmenin interfazı sonrasında primer spermatositler oluşur. Halen diploid ($2n$) olan kromozom sayısı birinci mayozun tamamlanmasıyla haploid sayıya (n) indirilir ve sekonder spermatositler meydana gelir. İkinci mayozu tamamlayan spermatitler artık yuvarlak spermatit adını alırlar ve çoğu epididimde geçen olgunlaşma sürecine girerek nihayetinde olgun, hareketli sperm hücrelerine dönüşürler (Şekil 2.5) (www.biology.emory.edu).



Şekil 2.5. Dişi (sol) ve erkek (sağ) gamet hücrelerinin mayoz sürecinin şematik gösterimi. Kesikli yeşil çizgiden sonraki kısım gametlerin erişkin hayattaki son olgunlaşma dönemini göstermektedir ve kadında yaklaşık 85 gün sürerken, erkekte yaklaşık 74 gün sürmektedir (www.biology.emory.edu)

Ancak bütün bu aşamalarda erkek genomunun epigenetik özelliklerinin sağlıklı bir şekilde yavruya aktarılması ve embriyonun gelişebilmesi için belirli şifreler spermde paketlenir. En önemli aşamalardan birisi histon protamin dönüşümü olmakla birlikte sperm metilasyonu, kromatinin üç boyutlu ultra yapısının oluşturulması ve DNA sıkışması hepsi önemli süreçlerdir. Bütün aşamalarda spermde sperme özgü epigenetik kodların korunması elzemdir. Çünkü sperm

nükleusunda kodu değişmemiş somatik benzeri kromatinin bulunması yavruya gereken epigenetik bilginin aktarılmasını ve sağlıklı bir embriyonun gelişmesini sağlayamaz [42].

2.2.1. Spermin epigenetiği

Türe ve dokuya özgü olan epigenetik, insanda diğer türlerle kıyaslanamayacak kadar karmaşık olmakla beraber; morfoloji ve fonksiyonu oldukça özel olan spermin epigenetiği de eşsizdir. Spermin epigenetik regülasyonunu anlamak için gelişimsel sürecini iyi bilmek gerekir. Aslında spermin tek fonksiyonu paternal genomu hasarsız olarak oosite kargolamak gibi görünse de bundan fazlası olduğunu düşünmek için yeterli düzeyde kanıta sahibiz [39,43]. Spermin genomik ve epigenomik organizasyonu, fertilizasyonda olduğu gibi, erken embriyogenezde de kritik öneme sahiptir.

Hayvan modellerinden çıkarımda bulunmanın zorluğu, kullanımı giderek artan yardımla üreme tekniklerinin (YÜT) sağladığı araştırma imkanları ile aşılmaktadır. En küçük manüplasyonların bile genomuna zarar verdiği oosite kıyasla sperm genomu oldukça dayanıklıdır. Bu durum kuyruklarını koparmak için ultrasonik etki kullanılan fare spermlerinde neredeyse hiç DNA hasarı olmadığının rastlantısal olarak keşfedilmesiyle gündeme gelmiştir [44]. Sperm genomu DNA dışı proteinlerin özel yapısı nedeniyle oldukça stabil ve korumalıdır.

Yuvarlak spermatitin hem 6 µm çapındaki nükleusunu hem de bazı hücresel kısımlarını 5.1 µm çapındaki olgun sperm başına sığdırmak için başka hiç bir dokuda görünmeyen özel düzenlenmeler yapılmalıdır. Sperm olgunlaşması sırasında türe ait genomik bilginin yanı sıra bireye özgü epigenetik bilgi de korunmaktadır. Dinamik bir süreç olan epigenetik kodun oluşumu, gametogenez sırasında meydana gelen beslenme değişimi ve stres gibi olaylardan etkilenmektedir [13].

Erkek infertilitesi ya da subfertilitesi ile ilişkili bulunan bazı genlerin epigenetik düzenlenmeleri Çizelge 2.2'de özetlenmiştir [12].

Çizelge 2.2. Erkek infertilitesi ile ilişkisi olduğu gösterilen genler/proteinler [12]

Gen/Protein	Epigenetik farklılık ve erkek infertilitesi ile ilişkisi
<i>MTHFR</i>	Hipermetilasyonu düşük semen kalitesi ve infertiliteye yol açar
<i>PAX8, NTF3, SFN, HRAS</i>	Hipermetilasyonu semen kalitesinin bozulmasına neden olur
<i>JHM2DA</i>	Knockout yapıldığında DNA paketleme bozulur ve infertilite olur
<i>IGF2, H19</i>	Metilasyon kaybı düşük sperm sayısı ile ilişkili
<i>RASGRF1</i>	İmprint lokusta hipermetilasyon düşük sperm kalitesiyle ilişkili
<i>GTL2</i>	İmprint lokusta hipermetilasyon düşük sperm kalitesiyle ilişkili
<i>PLAG1, D1RAS3, MEST</i>	İmprint lokusta hipermetilasyon düşük sperm kalitesiyle ilişkili
<i>KCNQ1, LIT1, SNRPN</i>	İmprint lokusta hipermetilasyon düşük sperm kalitesiyle ilişkili

2.2.2. Sperm protaminasyonu

Protaminasyon, sperme özgü ve olağan dışı bir epigenetik regülasyon türüdür. Sperm DNA'sına ait oldukça basit proteinler olan protaminler yalnızca olgun spermde bulunur. İçeriğindeki yüksek arjinin oranı nedeniyle daha pozitif yüklü olan protamin molekülü, negatif yüklü DNA'yı kendine daha güçlü çeker. Protamine bağlanmış olan DNA somatik hücre DNA'sına göre çok daha fazla sıkışarak stabilize edilebilir.

Mayoz bölünmesini tamamlamış sekonder spermatitler (yuvarlak spermatit) testis içindeki olgunlaşma sürecinde DNA'ya bağlı olan histonların %85-90'ının protaminlerle yer değiştirmesi işlemi olan protaminasyona uğrar [45]. Sperm DNA'sında kalan histonlar genellikle kromozomların perisentrik kısmında bulunur ve kromozomal bölgelerin fonksiyonel rollerine göre sınıflandırılmasına aracılık eder [46]. Histon-protamin dönüşümü henüz net olarak aydınlatılamamış bir süreçtir.

Protaminasyondan hemen önce sperme özgü histon varyantları ortaya çıkar ve histonlarla yer değiştirir. Ayrıca histon H4 hiperasetilasyonu gerçekleşir [46-48]. Hiperasetilasyonun bir kaskadı tetiklediği düşünülmektedir [49]. Histon asetilasyonu HAC ve HDAC'ler aracılığıyla regüle edilmektedir. Muhtemelen pygopus2 de bir diğer regülatördür. Pygopus2, wnt sinyalizasyon efektör kompleksinin kofaktörü olan bir bitki homeodomain proteinidir [50]. Hiperasetile histonlar DNA'ya daha az afinite göstererek kromatinin gevşek hale geçmesini sağlamaktadır. Serbest kalan DNA'da, topoizomerez bağımlı zincir ayrılması olur. Bu da DNA'dan histonların çıkartılıp yerine önce transizyon proteinleri (TP) ve daha sonra da protaminlerin getirilmesini sağlamaktadır [51,52].

Homo sapiens türünde tanımlanan dört tip transizyon proteini bulunmaktadır (TP1-4) ve bunlar histona göre daha basit ama protamine kıyasla daha karmaşık proteinlerdir. Spermiyogenezin son aşamasında transizyon proteinleri çıkarılarak yerine protaminler getirilir [53]. İnsan protaminleri Prm1 ve Prm2 olmak üzere iki tiptir ve 1/1 oranında olması sperm fonksiyonu için kritik önemdedir. Bu oranda görülen 0,8-1,2 standart sapmadan daha büyük değişimlerin infertilite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [54]. Prm1, posttranslasyonel fosforilasyon ve defosforilasyon modifikasyonlarına uğrar ve disülfid bağların oluşumu mümkün olur [55,56]. Prm2 ise spermiyogenez sırasında daha büyük bir öncü molekülün kesilmesi ile oluşur [57].

Sperm kromatinine protaminlerin katılması DNA sıkışmasını artırır ve genomun güvenli bir şekilde taşınması için kritik öneme sahip olan spermin son şeklinin verilmesini sağlar (Şekil 2.4) [7].

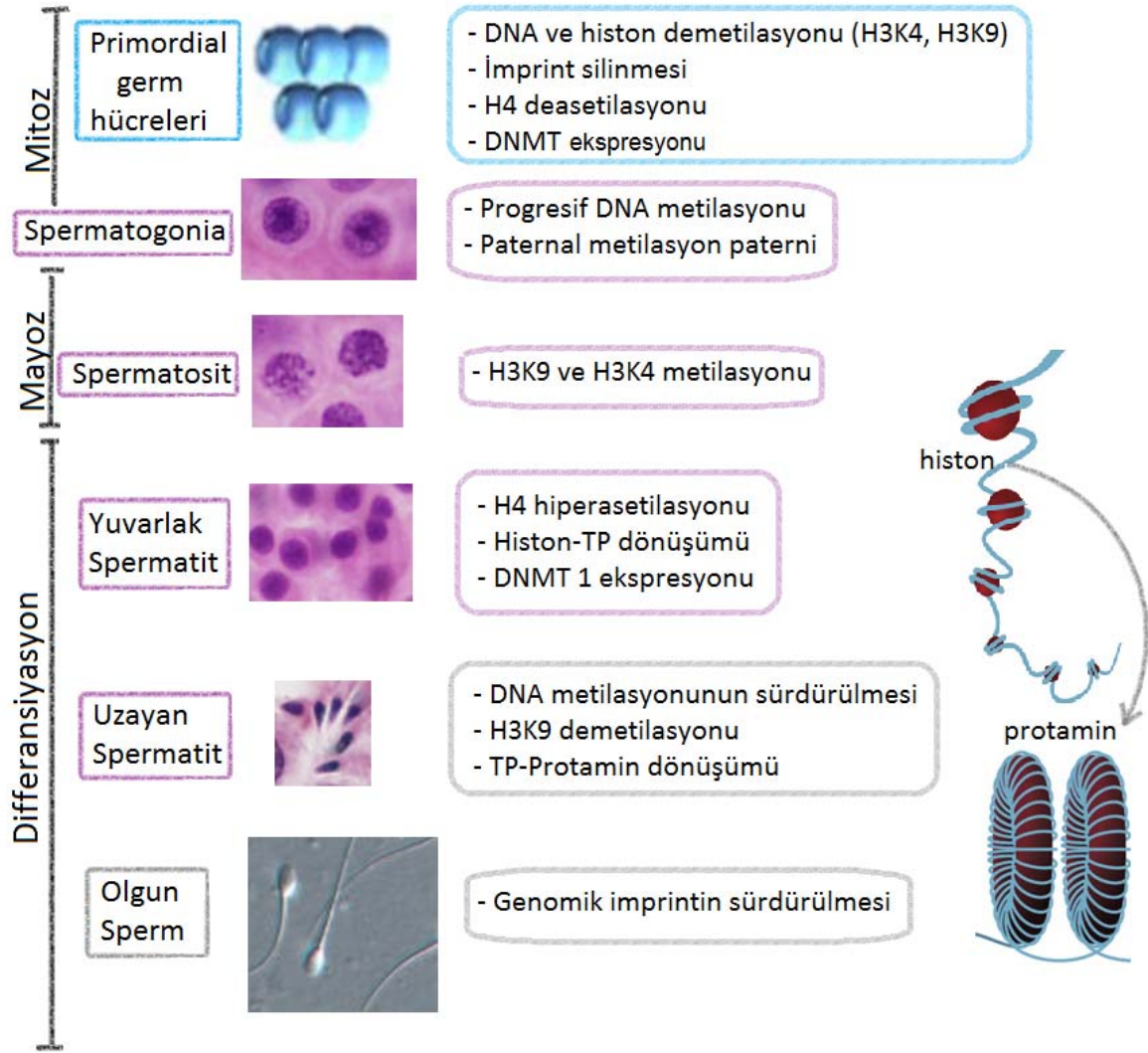
Olgun spermde %10-15 oranında bulunan histonların önceleri bir protaminasyon eksikliği olduğu düşünülse de epigenetik çalışmalar göstermiştir ki; korunan bu histonlar, aslında sperm genomunun zigot içindeki organizasyonu ve embriyogenezde oldukça önemli role sahiptir [58]. Testis spesifik Bromodomain içeren protein (BRDT) bazı hiperasetile histonlarla ilişkiye girerek muhafaza edilen histonlar ve sperm genomu organizasyonunda kilit önemde bulunmaktadır [59].

2.2.3. Sperm metilasyonu ve histon modifikasyonları

Testislerde ve testiküler germ hücrelerinde eşine rastlanmayan özel bir metilasyon paterni gözlenir. Testisteki hipometile DNA somatik dokudakinin 8 katıdır [42]. Bu lokusların çoğu tekrarlayan diziler değildir ve CpG adalarının dışında kalan bölgelerde ve ayrıca genellikle genlerin 5' ucundan uzaktadır. Yani testiküler hipometilasyon gen düzenleyici bölgelerde değildir. Ancak, CpG adası dışında kalan bölgelerin hipometilasyon düzeyi ilgili kromozomun CG içeriğiyle doğru orantılıdır. İlginç olarak somatik dokularda bu durum tam tersidir.

Sperm mayozundan önce ilk epigenetik olaylar gerçekleşir ve DNA progresif bir demetilasyon-metilasyon sürecine girer. Mayoz sırasında pakiten spermatositteki DNMT3A, DNMT3B ve kofaktör olarak da DNMT3L aktiviteleri ile doğumdan sonra tamamlanmak üzere de novo DNA metilasyonu düzenlenir [60]. Metilasyon kalıbı daha sonra DNMT1 aktivitesi ile korunur.

Bu DNA metilasyonu sürecine ek olarak metilasyon ve asetilasyon gibi histon modifikasyonları yapılarak DNA'nın transkripsiyon faktörlerine ulaşabilirliği değiştirilir. (Şekil 2.5) Gerçekte HMT ve HDM gibi spesifik enzimlerle histon H3'ün lizin 9'u (H3-K9) ve histon H3'ün lizin 4'üne (H3-K4) ait metilasyon paternleri düzenlenir. Genellikle mayozda histon H3-K9 metilasyonu yüksektir ama sürecin sonunda azalır böylece gen aktivasyonu sağlanır. Histon H3-K4'ün ise mayozda metilasyonu azdır ve bu da gen susturulması ile ilişkilidir [61]. Ayrıca spermatogenezis sırasında HAT ve HDAC gibi bazı enzimler de H3 ve H4 lizin rezidülerinin asetilasyon ve deasetilasyonunu kataliz eder. Spermiyogenezde ise H4'ün hiperasetilasyonu protaminasyon için kritik bir öneme sahiptir [62,63] (Şekil2.6).



Şekil 2.6. Spermatogenez ve spermiyogenez sırasında oluşan temel epigenetik düzenlenmelerin şematik gösterimi (1) Primordial germ hücreleri hem (imprinti silme amacıyla) DNA’da hem de histonlarda yaygın bir demetilasyon sürecinden geçer. Ayrıca H4 deasetilasyonu gerçekleşir. *DNMT3A*, *DNMT3B* ve *DNMT3L* bu aşamada eksprese olur (2) Spermatogoniumda paternal metilasyonu sağlayan progresif DNA metilasyonu meydana gelir (3) Spermatositlerde H3K9 ve H3K4 metilasyonu gözlenir (4) Yuvarlak spermatitlerde H4 hiperasetile hale gelir, *DNMT1* eksprese edilir ve histonlar TP’ler ile yer değiştirir (5) Uzayan spermatitte H3K9 demetilasyonu ile birlikte DNA metilasyonunun sürdürüldüğü izlenir. TP’lerin protaminlere dönüşümü bu aşamada görülür (6) Spermatozoada genomik imprint sürdürülür [38]

2.2.4. Sperme özgü histon varyantları

Mayoz bölünme sırasında germ hücrelerinin epigenetik profilleri değişir. Örneğin; premayotik spermatogonia, çok düşük H3K9me2 düzeyi gibi eşsiz bir histon modifikasyon paterni gösterir [64-66]. Ancak mayoz bölünmenin başlamasıyla

erkek germ hücrelerinde bu patern hızla değişir [67]. Haploid yuvarlak spermatitlerin nükleusunda global bir yeniden düzenlenme meydana gelir. Ancak inaktif X kromozomundaki H3K9me2 gibi histon işaretleri korunur [68,69]. Testis spesifik bir linker histon varyantı olan H1T2 bu aşamada oluşur ve spermiogenez sırasında meydana gelen kromatin sıkışmasında önemli bir görev üstlenir [70]. Daha sonra uzayan spermatitte başka bir linker histon varyantı olan H1ls1 (spermatid 1'deki histon-1 benzeri protein) eksprese olur.

İmmünohistokimyasal çalışmalarla; sperm kromozomlarının telomerlerinde, testise özgü bir Histon varyantı olan ve transkripsiyondan sonra 3' ucundan poliadenilasyona uğramayan H2B'nin yer aldığı gösterilmiştir [71]. Sperm genom organizasyonunda önemi net olarak belirlenemeyen diğer özgül histon varyantları arasında H1T, H1LS1, H2A.X, H3.3A ve H3.3B sayılabilir [53, 72-75]. Histon H3T ise testise spesifik bir histon varyantıdır. H3T'nin Nap2 şaperon tarafından bir araya getirildiği ve H3T içeren DNA'nın stabilizasyonunun konvensiyonel H3.1 içeren DNA'ya kıyasla daha az olduğu gösterilmiştir [76,77].

2.2.5. Sperm imprinti

İnsan genomu imprinti 16 kromozomda gruplanmış yaklaşık 70-80 bölgeyle sınırlıdır [78]. Bu bölgelerle ilgili delesyon ya da uniparental dizomi gibi anormallikler kendini özellikle büyüme, davranış ve hormon bozuklukları ile karakterize sendromlar olarak gösterir. Ayrıca imprint bozukluklarının intrauterin büyüme geriliği, artmış diyabet, kardiyovasküler hastalıklar riski ve mental bozukluklar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [79].

Fertilizasyondan sonra oosit ve sperme ait genomik imprint yeniden programlanır. Önce erkek pronükleus demetile edilir [80,81]. Zigotun oluşmasından sonra her iki ebeveynin kromozomları da, genomik imprint bölgeleri hariç, pasif bir demetilasyon sürecine girer [82]. İmprint genlerin metil kalıpları sadece primordial germ hücrelerinde silinir.

Önceleri oosit; içerdiği organeller, RNA'lar ve transkripsiyon makinası nedeniyle; embriyo gelişiminde aktif rol oynayan tek gamet zannediliyordu. Sperm ise

yalnızca 23 paternal kromozomu oosite taşıyan özel bir kargo hücresi olarak görülmektedir. Ancak erken embriyogenez sırasında spermin taşıdığı epigenetik modifikasyonların önemini keşfedilmesi bu konuya özel bir dikkat çekmiştir.

2.3. Diğer Epigenetik mekanizmalar

Yukarıda sayılan tüm mekanizmalar genetik kodun ifadesini DNA düzeyinde yapılan düzenlemelerle etkilemektedir. Transkripsiyon sonrasında açığa çıkan ara ürünler aracılığıyla da, DNA değişikliği olmadan gen ifadesinin değiştirilmesi yani, epigenetik düzenleme yapılması mümkündür. En önemli ara ürünler kodlayıcı olmayan kısa RNA molekülleridir [83].

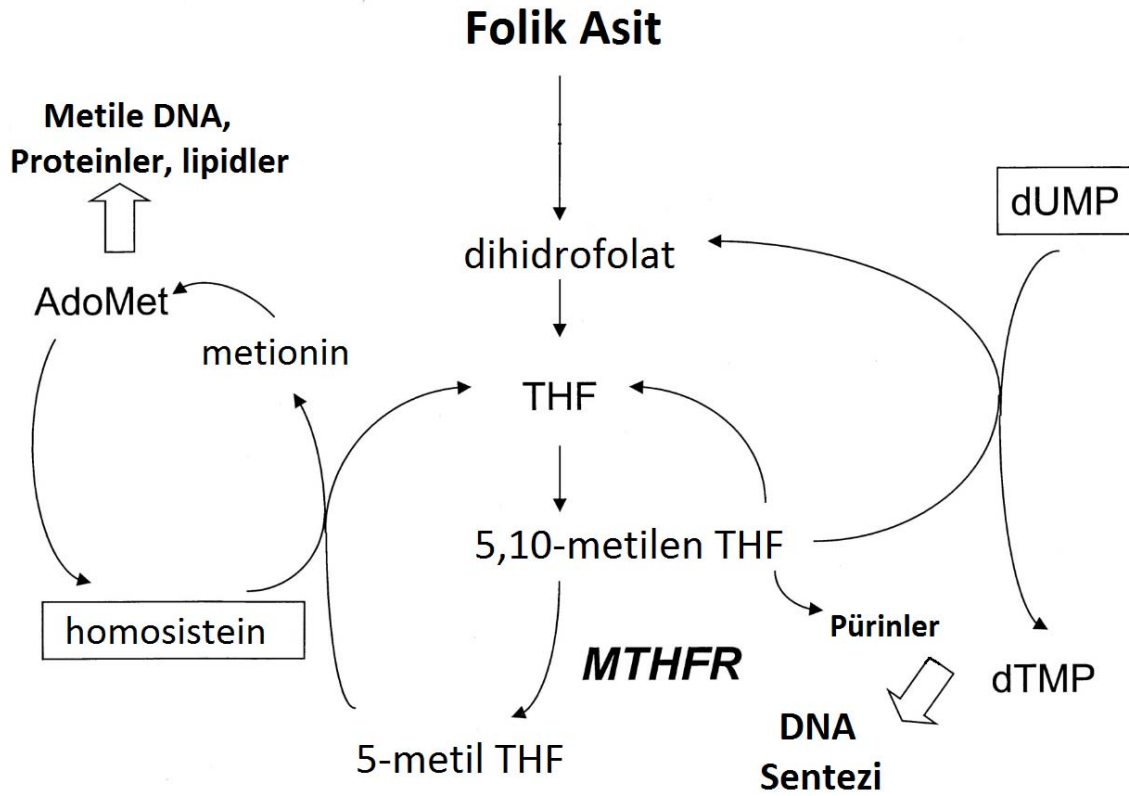
2.3.1. MikroRNA'lar

İnsanlarda sayıları bini geçen, protein kodlamayan mikroRNA (miRNA)'lar yaklaşık 20-23 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli RNA molekülüdür. DNA'dan transkripsiyonu yapılan ancak protein çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanan miRNA'lar, hedef genin mesajcı RNA (mRNA)'lara düşük özgüllükte bağlanmasına, mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona neden olabileceği için gen ifade edilmesinin kontrolünde önemli rollere sahiptir [84,85].

Hücre çekirdeği içinde RNA Polimeraz II (Pol II) veya III ile oluşturulan pri-miRNA'lar Rnaz III endonükleaz "Drosha" enzimi ve çift iplikçikli RNA bağlayıcı protein "Pasha" kompleksi tarafından işlenerek pre-miRNA'ya dönüştürülür [86]. Çekirdek zar proteini "exportin-5" aracılığıyla sitozole aktarılan pre-miRNA'lar doğrudan Rnaz III endonükleaz "Dicer"a bağlanır. Dicer, pre-miRNA sap-ilmliğini kestikten sonra, iki tamamlayıcı kısa RNA molekülü meydana gelir, ama bunlardan sadece biri RNA-uyartılı susturma kompleksine (RISC) dahil olur [87]. RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNaz olan argonaute'in etkisiyle bu ikisinden 5' ucu daha kararlı olanı (kılavuz iplikçik) seçilip bu komplekse dahil olur. Öbür iplikçik, anti-kılavuz veya yolcu iplikçik olarak adlandırılır ve RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir [87].

2.4. Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geni

MTHFR geni, metil siklusunda hız kısıtlayıcı basamağı katalizleyen MTHFR enzimini kodlayan gendir. MTHFR enzimi 5,10-metilentetrahidrofolat'ın 5-metiltetrahidrofolat'a dönüşümüne aracılık eder [17]. 5-metiltetrahidrofolat ise metiyonin sentezi için homosistein ile birlikte ko-sübstrattır (Şekil 2.7) [17].



Şekil 2.7. Metil siklusunda MTHFR enzimi [17]

MTHFR geni birinci kromozomun 1p36.23-p34.3 bölgesinde yer alan, 2,2 kb uzunluğunda ve 11 ekzondan oluşan bir gendir. Ekzonlar 102-432 baz uzunluğundayken intronlar 250-1500 baz uzunluğundadır. Gen ürünü, 70 ve 77 kDa'luk iki alt birimden oluşan sitoplazmik bir enzimdir.

MTHFR enzimi tek karbon metabolizmasında kilit enzimdir. Homosisteine bir metil grubunun aktararak metionin sentezlenmesini sağlar ve bu da DNA metilasyonu olduğu gibi diğer moleküllerin de metillenmesini mümkün kılar. İlginç olarak *MTHFR* geni kendisi de promotor bölgesinde yapılan metilasyonla regüle edilir.

[18]. MTHFR geni mutasyonu, polimorfizmi ya da epigenetik regülasyonla MTHFR enziminin yetersizliği meydana gelirse hiperhomosisteinemi ile karakterize hiperkoagülabilite oluşur. Ayrıca DNA metilasyonu global olarak azalır ve DNA sentezi de bozulur. *MTHFR* gen mutasyonu ile tekrarlayan gebelik kaybı arasında ilişki gösterilmiştir [88].

2.4. DNA metilasyon tayini

DNA metilasyonu orijinal olarak Southern blot yöntemi ve PCR amplifikasyonunu takip eden bir metilasyona özgü restriksiyon endonükleaz işlemi ile incelenmekteydi [89]. Günümüzde ise, bisülfite sekanslama, kombine bisülfite restriksiyon analizi (COBRA), MetilLight, bisülfite pyrosekanslama gibi gen spesifik teknikler kullanılmaktadır [90-92]. Bütün bu sayılan teknikler metile olmayan sitozin rezidüsünün bisülfite dönüşümüyle urasile çevirilerek metile sitozinin değiştirilmemesi, sonra da DNA sekanslama ile tespit edilmesi esasına dayanmaktadır [93].

Bisülfite dönüşüm teknikleri belirli gen bölgelerindeki metilasyon durumunun incelenmesi için sensitif, spesifik ve relatif olarak ucuz olan uygun tekniklerdir. Ancak tüm genomun metilasyonunu incelemek için bu yöntemler çok pahalı olmaktadır. Tüm insan metilomunun çalışılması için yeni jenerasyon sekanslama ya da tüm genom bisülfite sekanslama gibi yöntemler geliştirilmektedir [94,95].

2.5. DNA dizi analizi / DNA sekanslama

DNA dizi analizleri ya da sekanslama; DNA birincil yapılarının belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdir, DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelir. DNA sekanslama için geleneksel olarak Sanger dideoksi yöntemi ve daha yaygın da Maxam-Gillbert kimyasal degradasyon yöntemi kullanılsa da her iki yöntem de hem çok zahmetli hem de büyük gen bölgelerinin analizi için elverişli olmadığından günümüzde daha hızlı ve zahmetsiz sonuç almayı sağlayan shotgun yöntemi ve pyrosekans yöntemleri kullanılmaktadır [94].

Maxam-Gillbert kimyasal degradasyon yöntemi

Farklı uzunluktaki DNA parçalarının oluşumu ile sonlanan DNA'yı kesmek için kimyasalların (Hidrazin, dimetil sülfat ya da formik asit) kullanıldığı yöntemdir. Tek bir sekans jelinde 40 klonun analiz edilmesini sağlar. Yöntemin temel prensibi, DNA' da bulunan bazların kimyasallar kullanılarak değiştirilmesine ve daha sonra değişikliğe uğramış nükleotidlerin (Piperidin) bulunduğu noktalardan zinciri kırması esasına dayanır.

Dizi analizi yapılacak DNA, önce 5' ucundan fosfor ya da floresan bir boya ile işaretlenir. DNA'nın iki iplikçisi birbirinden ayrılarak, ya da DNA uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilerek DNA'nın bir ucundan işaretlenmesi sağlanır. Daha sonra DNA molekülleri dört tüpe ayrılarak A, C, G, T nükleotidlerini kırmak için gerekli tepkimeler gerçekleştirilir. Elde edilen boyları gittikçe kısalan DNA dizileri jel elektroforezi ile birbirlerinden büyüklüklerine göre ayrılır ve otoradyografi uygulanarak bantlar görüntülenebilir [95,96].

Sanger dideoksi yöntemi

Bu yöntem enzimatik DNA sentezine dayanır ve en yaygın kullanılan dizi analiz tekniğidir. Sekanslanacak DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. Yöntemin temeli, DNA polimerazın dNTP (deoksiribonükleozid trifosfat) ve ddNTP (dideoksiribonükleozid trifosfat) leri de substrat olarak kullanabilmesi esasına dayanır. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. Reaksiyon sonunda deoksinükleotidlerle uzamış ve ddNTP lerle sonlanmış farklı uzunlukta diziler elde edilir. Sonra jel elektroforez ile degradasyon yöntemindekine benzer şekilde farklı uzunluktaki DNA dizileri analiz edilir. Bunun için otomatik dizi analizi de kullanılabilir [96].

Shotgun yöntemi

Bu yöntemde çok büyük klonlanmış DNA parçaları bir çok parçaya bölünerek alt klonlar halinde dizileme yapılır. DNA parçaları sekanslandıktan sonra orijinal DNA yeniden yapılandırılmaya çalışılır. Bu yöntemde amaç; hem hız kazanmak hem de

doğruluk oranı daha yüksek sonuçlara ulaşmaktır. Özellikle kromozom analizlerinde ve genom projelerinde tercih edilir [96].

Pyrosekanslama

Dizi analizi için en sık kullanılan yöntem olan Sanger metodunun uzun sürmesi, bir çok aşamayı içermesi gibi çeşitli dezavantajlarını ortadan kaldıran, 1986 yılında Pal Nyren tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir [96]. Single-nükleotide addition (SNA) yani tek nükleotid eklenmesi yöntemi ile dizi analizi yapmaktadır. Sentez yaparak dizi analizi yapma prensibine dayanır. DNA sentezi esnasında açığa çıkan pirofosfat'ların saptanması esasına dayanan gerçek zamanlı bir kantitatif dizi analizi tekniğidir [96].

İşlem PCR ürünlerinin tek zincir DNA'ya (ssDNA) dönüşmesi ile başlar. Tek sarmal DNA kalıp olarak kullanılmak üzere izole edilir, her bir primer çifti biotin ile 5' ucundan işaretlenir. Sekans primeri PCR ile çoğaltılmış olan bir tek zincir DNA ile hibridize edilir. Enzim olarak DNA polimeraz, ATP sülfürlaz, lüsiferaz ve apiraz kullanılır. Substrat olarak adenosin 5' fosfosülfat ve lusiferin ile inkübe edilir [96].

Sekans analizi dNTP'lardan (deoksiribonükleotid trifosfat) ilkinin reaksiyona eklenmesiyle başlar. Eğer ilk eklenen dNTP kalıp DNA'daki baza komplementer ise ortamda bulunan DNA polimeraz, bu dNTP'nin DNA sarmalına eklenmesini kataliz eder. dNTP DNA kalıbına bağlanırken dNTP üzerindeki 2 adet fosfat açığa çıkar ve 2 fosfatlı bir yapı olan pirofosfat (Ppi) ortama geçmiş olur. Her nükleotid eklenmesinde bir pirofosfat serbest kalır. Ortama çıkan pirofosfat; ATP sülfürlaz ile ATP'ye çevrilir. Oluşan ATP kullanılarak lusiferin, oksilusiferin'e dönüştürülür. Oksilusiferin ise ATP miktarıyla orantılı olarak görünür bir ışın yayar. Bu ışın kızıl ötesi kamera ile tespit edilir ve seri tepecik şeklinde kaydedilir. Her bir tepeciğin yüksekliği eklenmiş olan nükleotid sayısı ile orantılıdır [96].

Nükleotid parçalayıcı bir enzim olan apiraz devamlı olarak ATP ve dNTP'leri parçalar. Böylece ışık oluşumu kesilir. Yani ortamda yeni reaksiyon oluşturacak dNTP ve ATP kalmamış olur ve bu şekilde ortam ikinci nükleotidin ilave edilmesine hazırlanır [96].

Bu teknoloji ile DNA parçacığının 100 nükleotide kadar olan kısmı okunabilir. Dört enzimin yer aldığı bu aşamalar kapalı bir sistemde, plakta ve tek bir kuyucukta yapılır. İşlemin süresi kısadır [96,97].

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, prospektif bir vaka-kontrol çalışmasıdır. Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmasının ardından "Hacettepe Üniversitesi, Androloji Ünitesinden semen örnekleri toplandı. Toplanan örnekler ilk değerlendirmenin ardından yıkanarak -70°C'de donduruldu ve saklandı. Örnek toplama işleminin yaklaşık 3 ayda tamamlanmasından sonra, örnekler kuru taşıma tankıyla "Gazi Üniversitesi, Yaşam Bilimleri Uygulama Araştırma Merkezi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı"na götürüldü. Eş zamanlı olarak çözündürülen örneklerden DNA izolasyonu yapıldı. DNA örneklerine Bissülfid dönüşümü işlemi uygulanmasının ardından pyrosekans® ile analiz yapıldı. Sonuçlar SPSS (Statistics Package for Social Sciences v.20) programı ile değerlendirildi.

3.1. Örneklerin Toplanması ve Sperm Değerlendirmesi

Çalışmaya "Hacettepe Üniversitesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum, İnfertilite Bölümü"ne başvuran ve açıklanamayan infertilite nedeniyle yardımcı üreme teknikleri (YÜT) bekleme listesinde olan 68 çift dahil edildi. Kontrol grubu ise aynı yaş grubunda spontan gebelikle en az bir sağlıklı çocuk sahibi olmuş çiftlerden oluşturuldu. Kontrol grubu için "Hacettepe Üniversitesi, Üroloji" kliniğinde farklı bir nedenle değerlendirilen ve sağlıklı bir şekilde çocuk sahibi olmuş 54 erkek çalışmaya davet edildi. Tüm işlemler Helsinki Deklerasyonu'na uygun şekilde gerçekleştirildi.

3.1.1. Örneklerin Toplanması

Gönüllülerden bilgilendirilmiş onam alınmasının ardından eğer cinsel perhiz süreleri 2-7 gün arasındaysa androloji laboratuvarındaki özel bir odada mastürbasyon ile alınan semen örneğinin toplanması sağlandı. Eğer cinsel perhiz süresi uygun değilse örnek alımı için randevu verildi. Örnek toplama işlemi Şubat-Haziran 2014 döneminde tamamlandı.

Çalışma Grubu

Çalışmaya en az 2 yıldır açıklanamayan infertilite tanısı bulunan 20-40 yaş arasındaki erkekler dahil edildi. Olguların normal histerosalfingogram, ovulasyon ve spermiogramı olan iyi tanımlanmış açıklanamayan infertilite olguları olmasına dikkat edildi. Çalışma grubu açıklanamayan infertilite nedeniyle en az iki kez gonadotropinle ovulasyon indüksiyonu ve intrauterin inseminasyon yapılmış ve YÜT bekleme listesinde olan çiftlerden meydana geliyordu. Çalışma grubu dışlama kriterleri şöyleydi:

- Bilinen bir genetik hastalık taşıyıcısı ya da sahibi olanlar
- Genital sistemi etkileyen ateşli ya da inflamatuvar bir hastalığı bulunanlar
- Genetik belirteçleri etkileyebilecek bir ilaç kullananlar (L-Karnitin, E-vit gibi)
- Kronik bir hastalığı olanlar
- Herhangi bir nedenle çalışmaya dahil olmaktan vazgeçenler

Olgular için Ek'te yer alan bilgi formları dolduruldu ve bilgilendirilmiş onam formları alındı.

Kontrol Grubu

Çalışmaya spontan gebelik elde etmiş ve sağlıklı bir şekilde en az bir çocuk sahibi olmuş çiftler davet edildi. Çalışmaya gönüllü olan erkeklerin 20-40 yaş grubunda ve eşlerinin de benzer demografik özelliklerde olmasına dikkat edildi. Temel ürolojik değerlendirmenin ardından sperm örneklerinin toplanması sağlandı. Kontrol grubunun dışlama kriterleri de çalışma grubuna benzer olmakla beraber ciddi düzeyde spermiogram bozukluğu olanlar da çalışmadan çıkarıldı. Yalnızca normal spermiogramı olanlar çalışmaya dahil edildi.

Sağlıklı gönüllüler için de yine Ek 1'de yer alan bilgi ve onam formları alındı.

3.1.2. Sperm Değerlendirmesi

Sperm örnekleri, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) tanısal işlemler ve araştırmalar için semen toplanması, 2010 standartları uyarınca alındı. Standart spermiogram için örnekler 37°C inkübatörde 30 dakika likefaksiyona bırakıldıktan sonra yapılan makroskopik değerlendirmenin ardından ilk mikroskopik değerlendirme yapıldı. Sperm morfoloji ve hareketlilik değerlendirmesi faz kontrast mikroskop ile x200 büyütme altında hazırlanan 20µm derinlikteki ıslak preperatta yapıldı. Sperm sayımı ise 100µm derinlikte Neubauer hemositometre kullanılarak yine DSÖ 2010 standartlarına göre yapıldı. Spermiogram; sperm konsantrasyonu 15 10^6 /mL'den fazla, total motilite %40'ın üzerinde, spermilerin %58'den fazlası vital ve normal morfoloji oranı %4'ün üzerinde ise normal olarak kabul edildi.

Sperm Yıkama

Spermiogramın değerlendirilmesinden sonra genetik çalışma için kullanılacak sperm örnekleri diğer hücre (örn. lökosit) ve debrislerin uzaklaştırılması amacıyla standart yıkama tekniği (santrifüj ve yüzdürme) kullanılarak yıkandı. Bunun için konik falcon tüpe alınan spermier 1:1 oranında sperm yıkama mediumu (AllGrad Wash®) ile karıştırıldı ve 200 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve dipte kalan pellet 0.5 ml medium ile tekrar karıştırılarak -70°C'de donduruldu.

3.2. Kullanılan Cihazlar

- Karbondioksitli etüv (Sanyo)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22R)
- Ph metre (WTW 422)
- Faz kontrast mikroskop (Zeiss)
- Derin dondurucu -70°C (Liebherr)
- Kuru taşıma tankı (MVE)
- Laminar flow (Danlaf)
- Hassas terazi (AND-ER-182A)
- Spektrofotometre (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan)

- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071)
- Spin vorteks (Biosan)
- Vorteks (Biosan)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Mikropipetler; 10µl, 100µl, 1000µl (Axygen)
- Pyromark Q24 (Qiagen)
- Derin dondurucu -70°C (Sanyo)
- Buzdolabı (Arçelik)

3.2. Kullanılan Sarf Malzemeleri

- Sperm toplama kabı (Sun plastik)
- 15 ml konik falcon tüp (Biologix)
- 200 µl eppendorf tüp (Biologix)
- 1,5 ml eppendorf tüp (Biologix)
- Pipet uçları 10, 100 ve 1000 µl (Biologix)
- Hücre dondurma tüpleri (Biologix)
- Pyromark plak (24 kuyucuklu plate) (Qiagen)

3.3. Kullanılan Kimyasallar

- Sperm yıkama medyum (AllGrad wash)

DNA ekstraksiyonu için

- X2 Tampon
 - 20 mM Tris Cl (pH 8.0)
 - 20 mM EDTA
 - 200 mM NaCl
 - 80 mM DTT
 - %4 SDS
 - 250 µg/ml Proteinaz K
- AL Tampon
- Etanol
- AE Tampon

Bisülfid dönüşümü için

- DNA koruyucu tampon
- Bisülfid karışımı
- RNaz içermeyen su
- BL tampon (*gunidin tuzu içerir beyazlatıcılarla karşılaştırılmamalıdır)
- BW tampon
- BD tampon
- EB tampon

Pyrosekans için

- PyroMark PCR Master karışımı
- CoralLoad Konsantrase karışımı
- Q solüsyonu
- MgCl₂
- RNaz içermeyen su

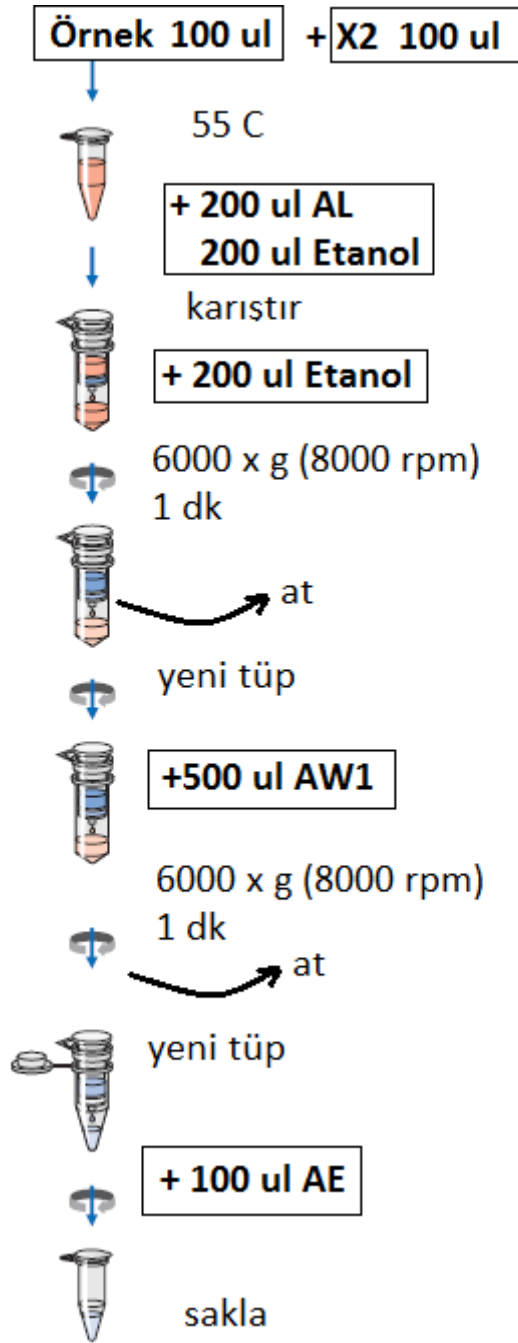
3.4. Kullanılan Kitler

- DNA izolasyon kiti (Qiaamp2®, kullanıcı modifiye, Qiagen)
- DNA bisülfid kiti (Epiect Plus®, Qiagen)
- MTHFR için PyroPCR kiti (ATQ)
- Pyrosekans kiti (Pyrosekans®, Qiagen)

3.5. Yöntemler

3.5.1. DNA izolasyonu

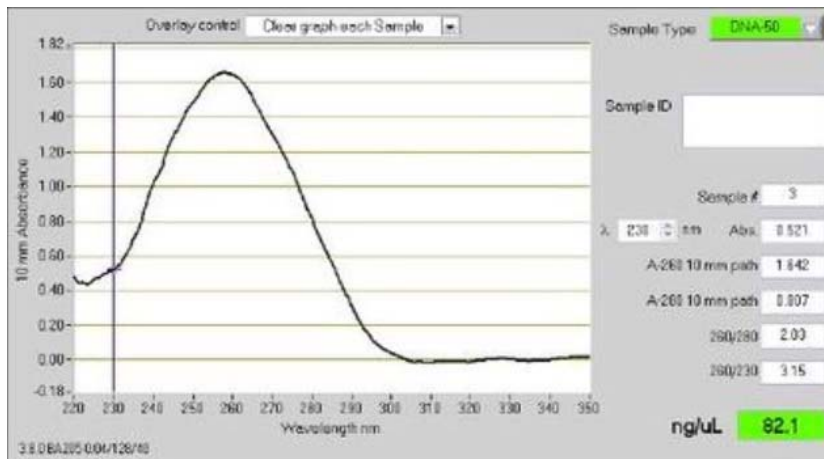
Konik falcon tüpte bulunan yıkanmış ve dondurulmuş sperm örnekleri oda sıcaklığında çözündürüldü. Orijinal olarak kan ve diğer biyolojik materyallerden DNA elde etmek için hazırlanmış ama spermden DNA izolasyonu için kullanıcılar tarafından adapte edilmiş QIAamp 2® kiti kullanıldı (Şekil 3.1) (QiAmp kullanma kılavuzu). Bunun için izlenen yöntem şu şekildedir:



Şekil 3.1. DNA izolasyonunun QIAamp mini kit kullanarak yapılışı (QiAmp kullanma kılavuzu)

1. 100 µl sperm 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve üzerine 100 µl tampon X2 eklendi. Bir saat boyunca 55°C'de inkübe edildi. Örneği karıştırmak için tüpler ters çevirilerek vortekslendi.
2. Örneklerle 200 µl tampon AL ve 200 µl etanol eklendi. Tekrar vortekslendi.
3. Tüpler kapaktaki materyalin düşmesi için 15 sn santrifüj edildi.

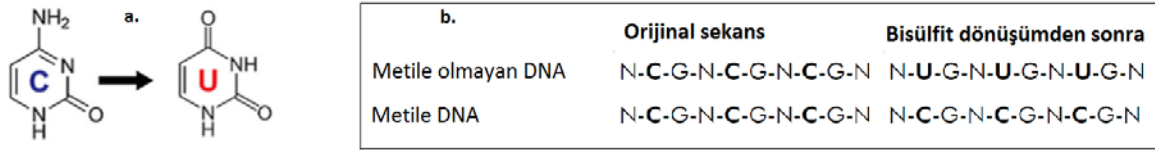
4. 200 µl %100 etanol eklendi ve yine 15 sn vortekslendi. Yine kapaktaki materyalin düşmesi için 15 sn santrifüj yapıldı.
5. Karışım kenarlarına değdirilmeden dikkatlice QIAamp mini kit ile verilen 2 ml'lik tüp içindeki mini spin kolonlara aktarıldı. Kapağı kapatılıp 1 dk 6000 x g (8000 rpm)'de santrifüj yapıldı. QIAamp mini spin kolonu temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne alındı ve filtreli diğer tüp atıldı.
6. QIAamp mini spin kolonu dikkatlice açıldı ve 500 µl AW1 tampon kenarlara değdirilmeden eklendi. Kapak kapatıldı ve yine 1 dk 6000 x g (8000 rpm)'de santrifüj yapıldı. Yine kolon temiz bir tüpe aktarılarak diğer filtreli tüp atıldı.
7. DNA'ya 100 µl AE tampon eklendi.
8. Spektrofotometrik olarak DNA miktar ölçümü yapıldı ve her bir tüpte 1 µg DNA olacak şekilde örnekler ayrıldı (şekil 3.2).
9. -70°C'de dondurulan DNA saklandı.



Şekil 3.2. Spektrofotometrik DNA ölçümü ekran alındısı örneği

3.5.2. Bisülfite dönüşümü

Yoğun bisülfite tuz derişimi altında, yüksek sıcaklık ve düşük pH koşulları mevcudiyetinde DNA'da bulunan sitozinlerin deamine olarak urasile dönüştürülmesi işlemidir (Şekil 3.3). Daha sonra DNA'da urasil karşılığı bulunmadığından karşısına adenin getirilmesi nedeniyle sitozin timine dönüştürülmüş olur. Bu işlem metile olmayan sitozinleri urasile dönüştürürken metile sitozinler sitozin olarak kalır.



Şekil 3.3. Metile olmayan sitozinin urasile dönüşmesi (a) ve bisülfid dönüşümden sonra DNA (b)

1. DNA örneklerinin oda sıcaklığında çözünmesi sağlandı. Bu sırada kit içinden çıkan bisülfid karışımları RNaz içermeyen suyla karıştırılarak hazırlandı.
2. DNA örnekleri de RNaz içermeyen su ile her bir örnek için toplam volüm 20 µl olacak şekilde karıştırıldı. Bu karışıma 85 µl bisülfid karışımı ve 35 µl DNA koruyucu tampon eklendi. Her bir örnek için toplam volüm 140 µl olacak şekilde tüpler hazırlandı.
3. Oda sıcaklığında PCR tüpleri kapatılarak karıştırıldı. DNA koruyucu tamponun bisülfid karışımın asidik pH'sı ile yeşilden maviye dönüştüğü gözlemlendi.
4. DNA bisülfid dönüşümü thermal cycler cihazı ile Çizelge 3.1'de tarif edilen döngüler uyarınca 5 saat içinde tamamlandı.

Çizelge 3.1. DNA bisülfid dönüşümü için thermal cyle döngüleri

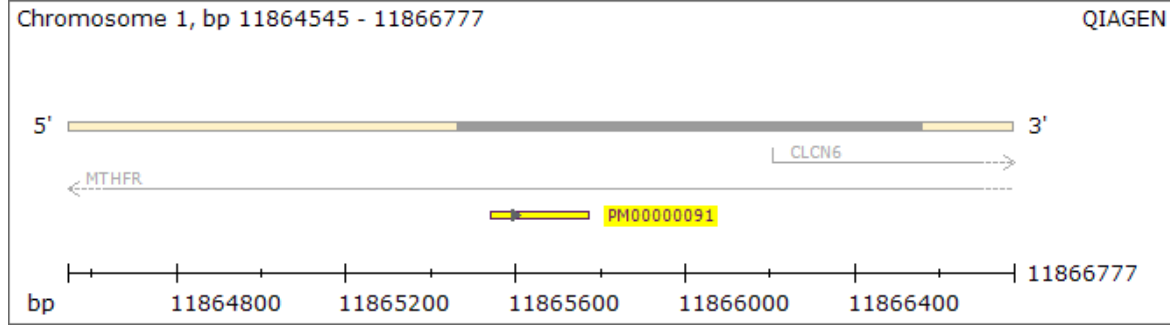
Aşama	Süre	Sıcaklık
Denatürasyon	5 dk	95°C
İnkübasyon	25 dk	60°C
Denatürasyon	5 dk	95°C
İnkübasyon	85 dk	60°C
Denatürasyon	5 dk	95°C
İnkübasyon	175 dk	60°C

5. Bisülfid dönüşümü tamamlanan PCR tüpleri 1 dk santrifüj yapılarak içindeki bisülfid reaksiyonu 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine alındı.
6. Her bir örneğe 310 µl BL tampon eklendi. Vortekslenerek karıştırıldı ve santrifüj edildi.

7. Her bir örneğe 250 µl etanol eklendi. Vortekslenerek karıştırıldı ve santrifüj edildi.
8. Örnekler MinElute DNA spin kolonlarını içeren toplama tüplerine alındı.
9. Spin kolonları maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi. Süzülen sıvı atıldı ve spin kolonları tekrar toplama tüplerinin içine yerleştirildi.
10. Her bir spin kolona 500 µl BW (yıkama) tamponu eklendi ve maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi. Süzülen sıvı atıldı ve spin kolonları tekrar toplama tüplerinin içine yerleştirildi.
11. Her bir spin kolona 500 µl BD (desülsonasyon) tamponu eklendi ve kapakları kapatılarak oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.
12. Yıkama için 10. basamakta tarif edilen işlem iki kez daha yapıldı.
13. Her bir kolona 250 µl %100 etanol eklendi ve maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi.
14. Spin kolonlar 2 ml'lik yeni tüplere yerleştirildi ve rezidü sıvıların uzaklaştırılması için 1 dk maksimum hızda santrifüj edildi.
15. Spin kolonlar temiz bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Her bir kolona dikkatlice 15 µl EB (elüsyon) tamponu eklenerek kapakları kapatıldı. 15,000 x g (12,000 rpm) 1 dakika santrifüj yapıldı.
16. Dönüşümü yapılan DNA kolonları -20°C'de dondurularak saklandı.

3.5.3. Pyrosekans

Dizi analizi yapılacak gen bölgesi 1. kromozomdaki MTHFR-CLCN6 geni promotorunda yer alan ve 3 CpG bölgesi içeren 36 bazlık Ch1, BP11865591-11865637 bölgesi ve GGTCAGTACCGATGGGGGCGAGGAYACGGGC sekansına sahip dizidir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Analiz edilen MTHFR CLCN6 geni promotor bölgesi

Bu gen bölgesini PCR ile çoğaltmak için kullanılan primerler:

Forward --- Biotin-TTGAGGCTGACCTGAAGCAC

Reverse --- Biotin-GTGATGCCCCATGTCTGGT

Dizi analizi yapmak için (pyrosekanslama) kullanılan sekans primeri ise:

Sekans --- GGTGTCTGCGGGAG

Bisülfid dönüşümü yapılmış DNA incelenecek gen bölgesinin amplifiye olması ve geri kalan kısmın eliminasyonu için ilgili bölgeye özgü dizayn edilmiş 5' ucundan biyotin ile işaretli primerler (forward ve reverse) kullanılarak klasik PCR yöntemiyle çoğaltılmalıdır. Bu çalışmada dizi analizi için önce pyrosekansa özgü PCR sonra da pyrosekanslama yapılmıştır.

Pyro PCR

Bu işlem için şu basamaklar izlenmiştir:

1. Dondurularak saklanan bisülfid dönüşüme uğramış DNA, Pyromark PCR master karışım, CoralLoad karışımı, primerler ve 25 mM MgCl₂ eritilerek oda sıcaklığında hazırlandı. HotStarTaq DNA polimeraz oda sıcaklığında inaktif olduğundan buzun üzerinde çalışılmadı.
2. PCR tüplerinde HotStarTaq DNA Polimeraz, PyroMark, PCR tamponu ve dNTP'leri içeren Pyro PCR karışımından 12,5 µl, CoralLoad karışımından 2,5 µl, 1 µl primerler, MgCl₂ ve RNaz içermeyen su nazik pipetlemeyle karıştırıldı ve her bir tüpte toplam hacim 20 µl olacak şekilde dağıtıldı.
3. Her bir tüpe 20'şer ng bisülfid dönüşüme uğramış DNA örnekleri yerleştirildi. Toplam hacim her bir örnek için 25 µl olarak ayarlandı.

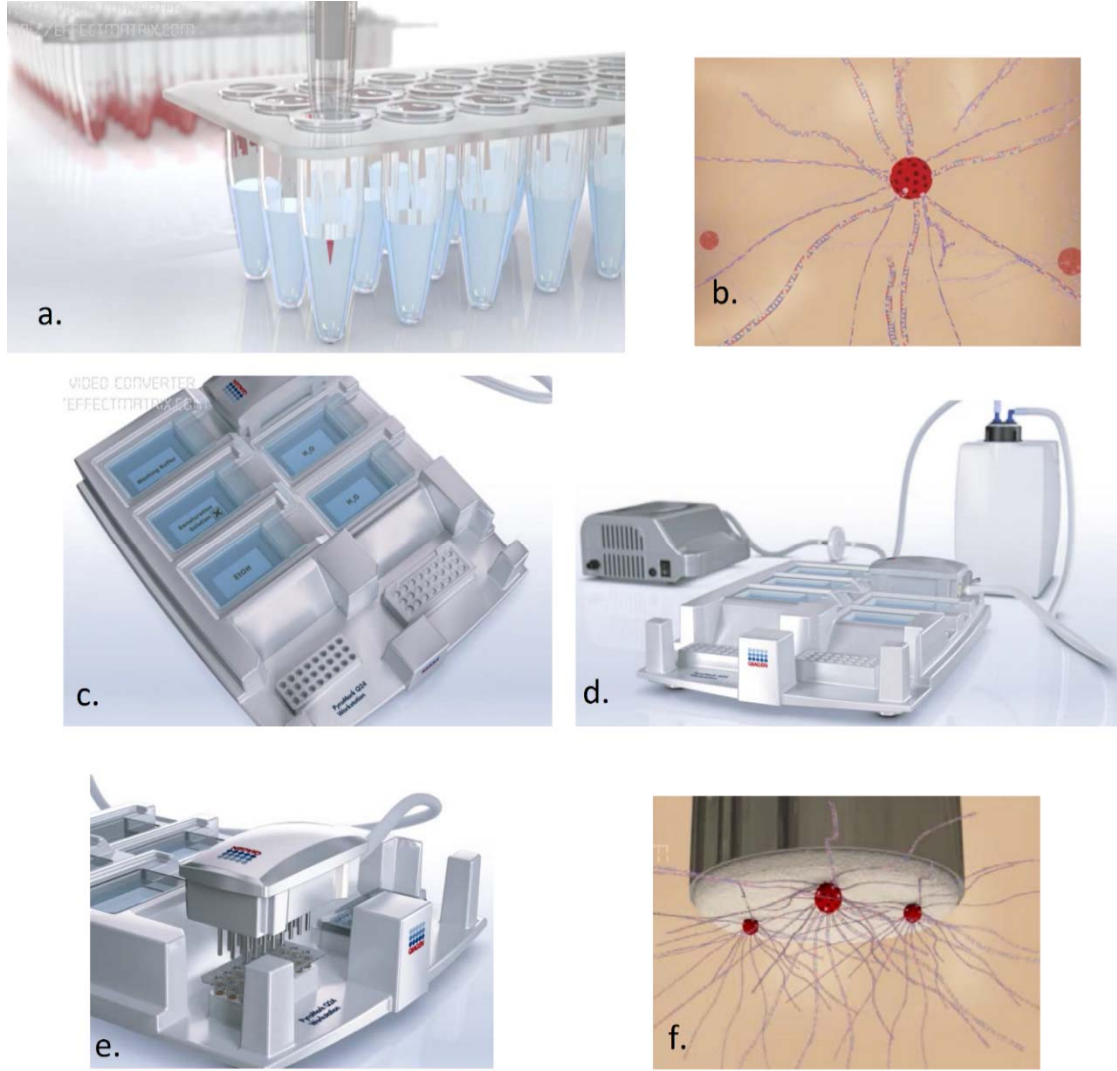
4. Örnekler çizelge 3.2’de belirtilen döngülerde thermal cyclera konuldu.
5. PCR amplifikasyonu ardından PCR ürünleri örneklerin ilk yarısı o gün çalışılacağı için oda sıcaklığında tutuldu ancak geri kalanı ertesi gün çalışılacağından buz dolabında (4°C) saklandı.
6. Takip eden Pyrosekans analizi için PCR ürünlerinden 10 µl olacak şekilde Q24 Pyroplakalara dağıtıldı (Şekil 3.5.a).

Çizelge 3.2. DNA bisülfite dönüşümü için thermal cyle döngüleri

	Süre	Sıcaklık
Başlangıç PCR aktivasyonu	15 dk	95°C
3 döngü PCR		
Denatürasyon	30 sn	94°C
Annealing	30 sn	65°C
Uzama	30 sn	72°C
Döngü sayısı	45	
Son uzama	10 dk	72°C

Pyrosekanslama yapılacak gen bölgesi 5’ ucundan biyotinle işaretlenmiş bir sense ve işareti bulunmayan bir antisense DNA’dan ibaret çift zincirli DNA dizisi şeklinde elde edilmiş durumdadır. Milyonlarca kopya PCR ürünü içeren örnekler pyrosekans cihazının 24 kuyucuklu plaklarına her birinden 10’ar µl olacak şekilde dağıtılmış durumdadır (Şekil 3.5.a). Pyrosekans karışımı içinde bulunan streptovidine ciddi affinite gösteren biyotinden tutturulan diziler büyük bir molekül haline getirilir (Şekil 3.5.b). Pyrosekans cihazı bir etanol, bir denatürasyon, bir yıkama ve iki de su havuzu olmak üzere toplam beş havuzdan oluşan bir cihazdır (Şekil 3.5.c). Cihaza 24 örnek tüpüne uygulanabilecek şekilde yan yana yerleştirilmiş 24 adet ucunda streptovidinein geçemeyeceği filtre bulunan kolonları içeren başlık ve buna bağlı aspirasyon eklenmiştir (Şekil 3.5.d). Cihaza içinde pyro PCR ürünleri bulunan 24 örneğin olduğu plak yüklendikten sonra filtreli kolon başlığın vakumu açılır ve önce etanolle yıkama işlemi yapılır (Şekil 3.5.e). Bu sırada tüm artıklar aspire edilirken streptovidine biyotinle tutunmuş PCR ürünleri filtreden geçemediği için tüplerin içinde kalır (Şekil 3.5.f). Yıkamadan sonra sırasıyla denatürasyon ve tekrar yıkama yapılır. Denatürasyon yapılırken ucunda

biyotin olmayan antisens zincir de uzaklaştırılmış olur. Elde edilen 5'ucunda biyotin işaretli dizi analizi yapılacak sense zincirler daha küçük hacimli kuyucukları olan asıl pyrosekans plakasına alınır.



Şekil 3.5. Pyrosekanslama için PyroMark® Q24 cihazının çalışma prensibi

En son plakadaki kuyucuklarda pyro primeri bulunmaktadır ve zincirde karşılığını bularak sentez için hazır hale gelir. Bu aşamada plaka pyrosekans cihazına yüklenir (Şekil 3.6).

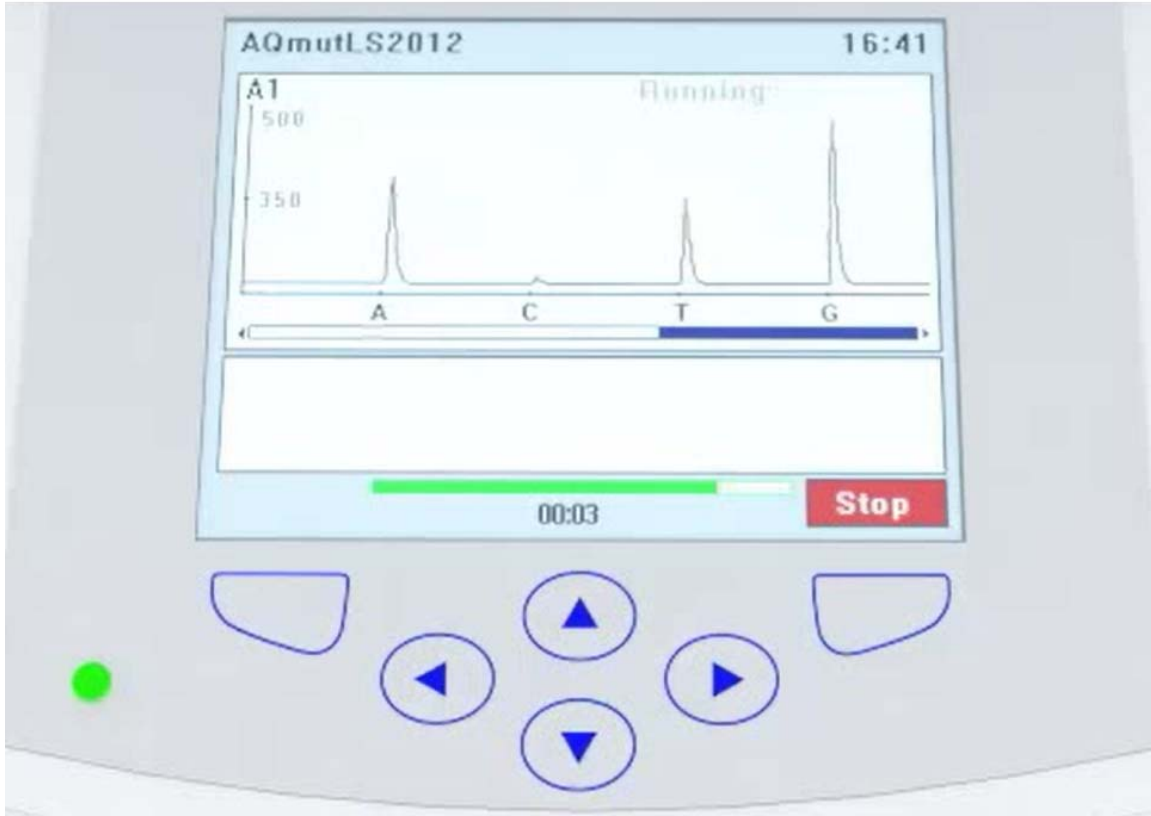


Şekil 3.6. 24 kuyucuklu pyrosekans cihazı (PyroMark® Q24)



Şekil 3.7. Pyrosekans cihazının kartuşu (solda) ve kartuşa yüklenen sıvıların şeması (sağda)

Pyrosekans cihazının kartuşu enzim karışımı, sübstrat karışımı ve nükleotidler olmak üzere doldurulduktan sonra o da cihaza yüklenerek analize başlanır (Şekil 3.7). Enzim karışımının içinde 4 adet enzim bulunmaktadır; DNA polimeraz, ATP sülfürlaz, lüsiferaz ve apiraz. Diziye sırasıyla A, C, G, T primerleri yüklenirken DNA polimeraz diziye eğer o nükleotid uygunsa sentez yapar ve pirofosfat açığa çıkar. Bu pirofosfatı kullanan ATP sülfürlaz diziye eklenen her bir nükleotid için bir birim ATP sentezlenmesini sağlar. Sentezlenen ATP'leri kullanan lüsiferaz ise her bir birim ATP için bir birim ışıma yapar. Apiraz ise diğer nükleotid yüklenmeden önce öteki nükleotidleri ortadan kaldırır. Açığa çıkan ışıma düzeyini ölçen cihaz yazılımını kullanarak dizi analizini ortaya koyar (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Pyrosekans cihazının dizi analiz çıktısı

3.7. İstatistiksel analiz

DNA sekans analizi PyroMark Q24 yazılımı ile yapıldı. Sonuçlar SPSS v.20.0 istatistik programı ile değerlendirildi. Verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Komogorov-Smirnov testi kullanılarak sınıandı. Çalışma ve control grupları demografik verilerinin karşılaştırması için t-testi kullanıldı. Varyansların eşitliğinin kıyaslanması için Levene testi yapıldı ve yine iki grup arasındaki ortalamaların eşitliğinin kıyaslanması için t-testi uygulandı. Her iki grup arasında metilasyon oranlarının kıyaslanması için bir nonparametrik test olan Mann Whitney U-testi yapıldı. Belirli bir metilasyon oranının hipermetile olarak değerlendirilebilmesi için bir eşik değer tespiti amacıyla ROC analizi yapıldı. Tespit edilen eşik değere göre hipermetile ve normometile olan bireylerin kıyaslanması için de ki-kare testi yapıldı. Çalışma grubunda normal ve hipermetile bireyler arasında farklılık olup olmadığı ise yapılan bir grup içi analiz ile değerlendirildi. P değerlerinin 0.05'den küçük olduğu değerler istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Demografik verilerin değerlendirilmesi ve metilasyon düzeylerinin kıyaslanması

Çalışmaya katılmayı kabul eden 68 infertil olgu ve 54 sağlıklı kontrol olgusundan örnek verilememesi, çalışmadan çıkmak istemek, dışlama kriterlerinden birinin bulunduğu anlaşılmaması, oligoastenoteratozoospermi tespit edilmesi ya da numune ile ilgili bir sorun olması nedeniyle 42 adedinin sonucu değerlendirilmedi.

Çalışma ve kontrol gruplarında 40'ar bireyin sperm DNA ekstraksiyonu ve MTHFR gen promotoru hipermetilasyonunun çalışılması uygun bulundu. Sonuçlar çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışma ve kontrol grupları demografik verileri ve sonuçların özeti

	Açıklanamayan Erkek İnfertilitesi (n=40)	Kontrol (n=40)	P değeri
Yaş (yıl, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	30,7 $\pm$ 5,2 (21-40)	29,3 $\pm$ 6,0 (20-40)	0,33
Kadın yaşı (yıl, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	28 $\pm$ 3,2 (20-34)	27 $\pm$ 2,5 (18-38)	0,30
Evlilik yaşı (yıl, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	23 $\pm$ 2,83 (18-30)	22 $\pm$ 3,7 (18-34)	0,40
İnfertilite süresi (yıl, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	6,7 $\pm$ 1,83 (2-17)	-	-
Çocuk Sayısı (ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	-	1,6 $\pm$ 0,83 (1-4)	-
Sigara	17	19	0,78
Alkol	5	4	0,86
Cinsel Perhiz (gün, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	3,7 $\pm$ 1,12 (3-7)	4,1 $\pm$ 1,10 (3-7)	0,54
Semen Hacmi (ml, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	2,9 $\pm$ 1,03 (1,5-4,5)	3,1 $\pm$ 1,20 (1,5-4,5)	0,47
Sperm Sayısı (milyon/ml, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	49,6 $\pm$ 29,0 (15-154)	46,7 $\pm$ 30,2 (15-122)	0,42
Motilite (% , ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	61,4 $\pm$ 14,0 (40-85)	59,3 $\pm$ 15 (38-86)	0,93
Vitalite (% , ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	71,3 $\pm$ 11,2 (60-90)	74,1 $\pm$ 9,0 (60-95)	0,82
DNA Konsantrasyonu (ng/ μ l, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	33,07 $\pm$ 22 (2,1-80,0)	36,5 $\pm$ 26,3 (2,7-111,7)	0,43
Metilasyon oranı (% , ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	11,0 $\pm$ 18,8 (1-77)	4,3 $\pm$ 6,2 (2-10)	0,01
Hypermetile (adet)	21	2	0,0001

Sperm MTHFR gen bölgesi promotoru hipermetilasyonu ve açıklanamayan erkek infertilitesi arasında istatistiksel olarak güçlü kanıt düzeyinde ilişki bulunmuştur.

Çalışma grubunda ortalama $11,0 \pm 18,8$ (1-77) olan metilasyon oranı ortalama $4,3 \pm 6,2$ (2-10) olan kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0,01$).

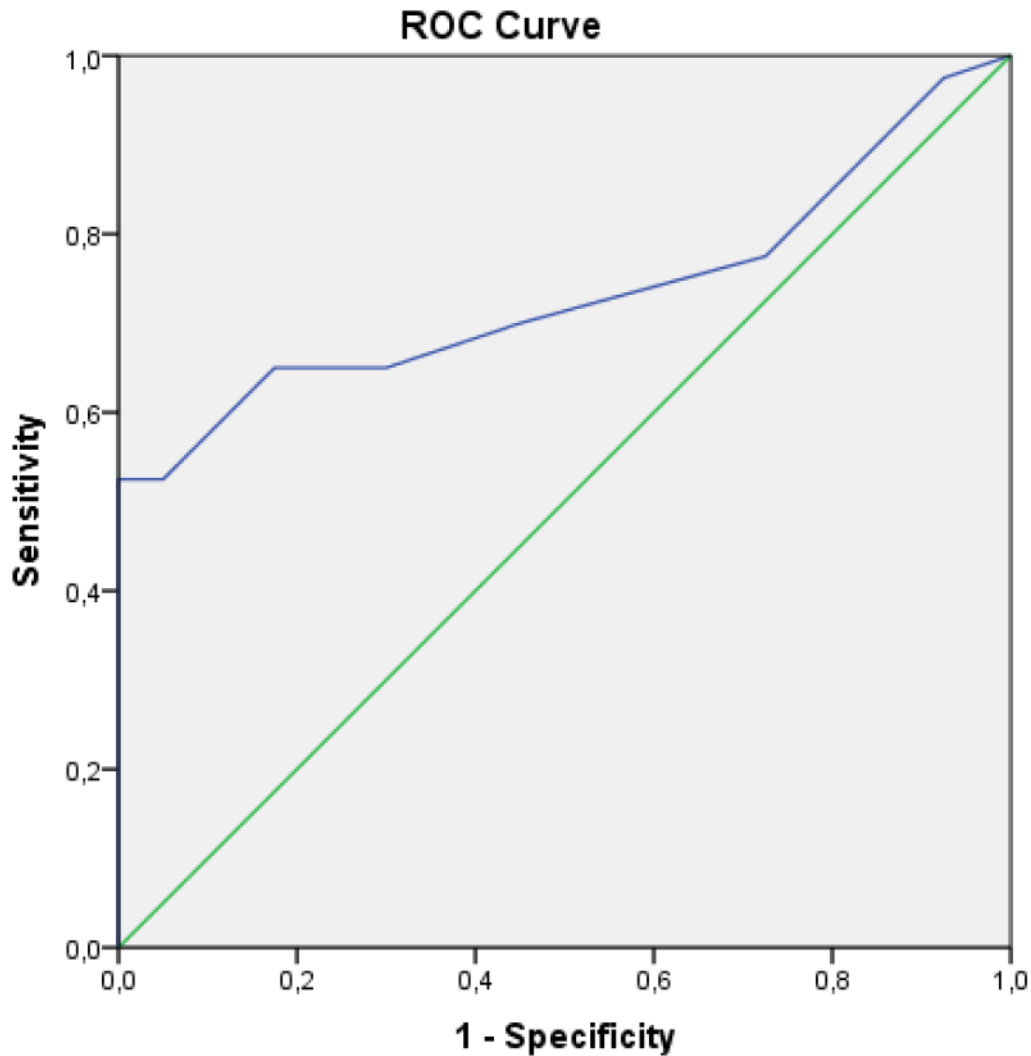
Çalışma ve kontrol grupları arasında sorgulanan demografik veriler olan yaş, eşinin yaşı, evlilik yaşı, sigara ve alkol kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Olguların yaş ortalaması çalışma grubunda $30,7 \pm 5,2$ (21-40) olarak bulunurken kontrol grubunda $29,3 \pm 6,0$ (20-40) bulunmuş ve aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p=0,33$). Olguların eşlerinin yaş ortalaması çalışma grubunda $28 \pm 3,2$ (20-34) olarak bulunurken kontrol grubunda $27 \pm 2,5$ (18-38) bulunmuş ve aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p=0,30$). Olguların evlenme yaş ortalaması ise çalışma grubunda $23 \pm 2,83$ (18-30) iken kontrol grubunda $22 \pm 3,7$ (18-34) olarak saptanmış ve yine aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p=0,40$).

Kontrol grubunun ortalama $1,6 \pm 0,83$ (1-4) çocuğu bulunurken çalışma grubunda infertilite süresi ortalama $6,7 \pm 1,83$ (2-17) yıl olarak tespit edilmiştir. Sigara kullanan birey sayısı çalışma ve kontrol gruplarında sırasıyla 17 ve 19 olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,78$). Yine düzenli olarak alkol kullanan birey sayıları çalışma ve kontrol gruplarında sırasıyla 5 ve 4 olup bunlarında arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p=0,86$).

Tespit edilen veriler ve DNA konsantrasyonları bakımından da istatistiksel olarak anlamlı sayılabilecek farklılık bulunamadı. Cinsel perhiz süresi çalışma grubunda ortalama $3,7 \pm 1,12$ (3-7) gün iken, kontrol grubunda $4,1 \pm 1,10$ (3-7) gün olarak belirlenmiştir ve aralarındaki fark istatistiki olarak anlamsızdır ($p=0,54$). Semen volümü çalışma ve kontrol gruplarında sırasıyla ortalama $2,9 \pm 1,03$ (1,5-4,5) ve $3,1 \pm 1,20$ (1,5-4,5) mililitredir ($p:0,47$). Ortalama sperm sayısı mililitrede çalışma ve kontrol gruplarında sırasıyla $49,6 \pm 29,0$ (15-154) ve $46,7 \pm 30,2$ (15-122) milyon olarak belirlenmiş ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,42$). Çalışma grubunda sırasıyla $61,4 \pm 14,0$ (40-85) ve $71,3 \pm 11,2$ (60-90) olarak bulunan motilite ve vitalite ortalamaları da kontrol grubunun sırasıyla $59,3 \pm 15$ (38-86) ve $74,1 \pm 9,0$ (60-95) olan ortalamalarından farklı değildir ($p=0,93$; $p=0,82$). Spermden elde edilen DNA konsantrasyon ortalamaları çalışma grubunda

33,07±22 (2,1-80,0) ng/μl iken kontrol grubunda 36,5±26,3 (2,7-111,7) ng/μl olarak tespit edilmiştir ($p=0,43$).

Hiper-metile ve normal bireylerin tespit edilmesinde kullanmak üzere metilasyon oranında bir eşik değeri belirlemek için roc analizi yapılmıştır (Şekil 4.1). Bu analize göre %9,5'in bir bireyi hiper-metile kabul etmek için %80 sensitivite ve %80 spesiviteyle kabul edilebilir bir eşik değeri olduğu tespit edilmiştir. Buna göre çalışma grubunda normal ve hiper-metile bireyler ayrılarak bir grup içi analiz yapılmıştır.



Şekil 4.1. Bir olguyu hipermetile kabul edebilmek adına belirli bir metilasyon oranının eşik değeri olarak alınabilmesi için yapılan ROC analizi

4.2. Çalışma Grubunun Grup İçi Analizi

Metilasyon oranı %9,5 eşik değer kabul edilerek çalışma grubundaki bireyler hipermetile ve normal olarak iki alt gruba ayrıldı. Oluşturulan yeni alt grupların sonuçları Çizelge 4.2’de özetlenmiştir. Yaş, eş yaşı, evlilik yaşı, infertilite süresi, sperm parametreleri ve elde edilen DNA konsantrasyonları uyarınca hiç bir istatistiki olarak anlamlı farklılık tespit edilememiştir.

Çizelge 4.2. Çalışma grubunun grup içi analizi özet sonuçları

	Hipermetile (n=21)	Normal (n=19)	P değeri
Yaş (yıl, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	29 $\pm$ 5,3 (20-37)	33,2 $\pm$ 3,9 (26-40)	0,26
Kadın yaşı (yıl, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	26,5 $\pm$ 3 (20-34)	28,5 $\pm$ 3,3 (20-34)	0,8
Evlilik yaşı (yıl, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	21,8 $\pm$ 2,3 (20-27)	23,5 $\pm$ 3,2 (19-30)	0,14
İnfertilite süresi (yıl, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	7,3 (2-17)	6,1 (2-12)	0,05
Sigara	8/21	9/19	0,7
Alkol	2/21	3/19	0,8
Cinsel Perhiz (gün, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	4 $\pm$ 1,32 (3-7)	3,42 $\pm$ 0,8 (3-6)	0,3
Semen Hacmi (ml, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	3 $\pm$ 1,2 (1,5-5)	2,8 $\pm$ 0,9 (2-4,5)	0,3
Sperm Sayısı (milyon/ml, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	49,3 $\pm$ 19,3 (15-89)	49,9 $\pm$ 38 (15-154)	0,9
Motilite (% , ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	58,3 $\pm$ 16,3(40-80)	64,8 $\pm$ 10,4 (40-85)	0,06
Vitalite (% , ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	70,2 $\pm$ 10 (60-85)	71,8 $\pm$ 11,1(60-90)	0,84
DNA Konsantrasyonu (ng/ μ l, ortalama $\pm$ SS) (dağılım)	28 $\pm$ 21(2-76,6)	24 $\pm$ 21 (7-72,4)	0,31

MTHFR promoturunda hipermetilasyon olan erkeklerin yaş ortalaması 29 $\pm$ 5,3 (20-37) bulunurken, normal erkeklerin yaş ortalaması 33,2 $\pm$ 3,9 (26-40) olup aralarındaki fark anlamlı değildir ($p=0,26$). Hipermetile bireylerin eşlerinin yaş ortalaması 26,5 $\pm$ 3 (20-34) olarak tespit edilmiş ve normal bireylerin eşlerinin 28,5 $\pm$ 3,3 (20-34) olan yaş ortalamasından farklı bulunmamıştır ($p=0,8$). Hipermetile ve normal grubun evlilik yaş ortalamaları ise sırasıyla 21,8 $\pm$ 2,3 (20-27) ve 23,5 $\pm$ 3,2 (19-30) olup aralarındaki fark anlamlı değildir ($p=0,14$). Hipermetile olan erkekler ortalama 7,3 (2-17) yıllık infertilite süresine sahipken normal erkeklerin infertilite süresi ortalama 6,1 (2-12) yıldır; ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p=0,05$).

Sigara ve alkol kullanımı yönünden grup içinde farklılık bulunmamıştır ($p=0,7$; $p=0,8$). Hipermetile grupta 8 kişi düzenli olarak sigara içerken, bunlardan ikisi de alkol kullandığını bildirmiş, normal grupta ise sigara içen sayısı 9 iken, bunlardan 3'ü de alkol kullandığını belirtmiştir.

Cinsel perhiz süresi hipermetile erkeklerde ortalama $4\pm1,32$ (3-7) gün iken, normal olanlarda $3,42\pm0,8$ (3-6) gün olarak tespit edilmiştir ve aralarındaki fark istatistiki olarak anlamsızdır ($p=0,3$). Semen hacim ortalamaları hipermetile ve normal bireylerde sırasıyla $3\pm1,2$ (1,5-5) ve $32,8\pm0,9$ (2-4,5) mililitredir ($p=0,3$). Ortalama sperm sayısı mililitrede hipermetile ve normal gruplarda sırasıyla $49,3\pm19,3$ (15-89) ve $49,9\pm38$ (15-154) milyon olarak belirlenmiş ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,9$). Hipermetile grupta sırasıyla $\%58,3\pm16,3$ (40-80) ve $\%70,2\pm10$ (60-85) olarak bulunan motilite ve vitalite ortalamaları da normal grubun sırasıyla $\%64,8\pm10,4$ (40-85) ve $\%71,8\pm11,1$ (60-90) olan ortalamalarından farklı değildir ($p=0,06$; $p=0,84$). Spermden elde edilen DNA konsantrasyon ortalamaları hipermetile erkeklerde 28 ± 21 (2-76,6) ng/ μ l iken normal erkeklerde 24 ± 21 (7-72,4) ng/ μ l olarak tespit edilmiştir ($p=0,31$).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızın sonuçları anormal sperm metilasyonunun erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu bilgisi ile tutarlıdır. 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 [98,99]. 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, DNA metilasyonudur. Sperm DNA'sında bir çok metilasyon hedefi bulunmaktadır. Bu hedeflerin büyük bir kısmını milyonlarca tekrarlayan DNA elemanı oluşturur. Tekrarlayan DNA elemanlarının metilasyonu ile amaç, parazitik ya da transpoze gen ifadenmesinin 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 [11]. Metilasyon çalışmalarının sekans spesifik olarak yapılması daha yararlıdır.

Spermin epigenetik düzenlenmesi eşsiz özelliklere sahiptir. Sperm gelişimi sırasında özel bir çeşit kromatin düzenlenmesi yapılmasının yanı sıra iki dalga şeklinde olan demetilasyon ve *de novo* metilasyon süreçleri yaşanır. Metil kalıplarının ilk silinmesi erken embriyogenez sırasında olur. Sperm hücrelerine dönüşecek olan primordial germ hücrelerindeki metil kalıpları, diğer tüm hücrelerle beraber, silinir ve hepsi somatik benzeri *de novo* metilasyona uğrar. Sperm öncülü hücreler ikinci bir silinmeye daha maruz kalır. Bu silinme hemen mayozdan önce tip A spermatogoniumlarda görülür [42]. Demetilasyon DNA replikasyonu yapmayan sperm öncüllerinde görülmez [60]. Spermin metilasyonu daha sonra sekans spesifik olarak yapılır ve daima pakitenden önce biter. Metilasyonun temel hedefi CpG adaları dışındaki bölgelerdir ama CpG adaları da metillenebilir. Belirli

genlerin metilasyon durumu spermatogenez sırasında değişir ve bu gen ekspresyonu ile ilgili olmak zorunda değildir [100].

Sperm epigenomu bireyden bireye farklılık gösterdiği gibi aynı erkekte de farklı zamanlarda farklı özellikler tespit edilebilir [101]. Spermin metilasyonu ile ilgili değişiklikler mayozdan önceki demetilasyonun yetersiz oluşu ya da de novo metilasyon sırasındaki bir bozukluk nedeniyle olabilir. Anormal metilasyondan ziyade önceki metil kalıbının silinmesindeki yetersizlik daha kolay ve olası bir mekanizmadır. Dışiden farklı olarak erkek gametogenezi yaşam boyu yinelenen mayoz bölünmeleri içerdüğinden sperm epigenetiği de yaşamsal etkilere bağlı olarak değişir.

İnfertilite ile sperm DNA metilasyonu arasında ilişki, ilk olarak imprint genlerde çalışılmıştır [102-104]. Bu çalışmalarda bir ya da iki gen sekansı metilasyon spesifik PCR yöntemi ile incelenmiştir. İmprint genler 16 kromozomda kümelenmiş ve genin maternal ya da paternal orijinde monoallelilik ifadenmesinin sağlandığı, yaklaşık 70 adet gendir [105]. Spermatogenezde izlenen ve aslında paternal imprintin doğru şekilde gamete aktarılması amacını taşıyan temel epigenetik düzenlemelerde, karşılaşılan olası bir sorunun sperm kalitesi ve fertilizasyon başarısını etkilemesi beklenen bir sonuçtur.

Sperm epigenetiğinde meydana gelen bozuklukların düşük sperm kalitesi ve azalmış fertiliteye yol açtığı, imprint ve nonimprint genleri kapsayacak şekilde daha fazla sekansta, ilk defa Houshdaran ve ark. tarafından gösterilmiştir [106]. Bu çalışmada olguların infertilite kliniği net belirtilmemekle beraber tespit edilen epigenetik anomalilerin ciddi sperm kalite bozukluğu ile korele olduğu bildirilmiştir.

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 [107]. 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 [14].

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 [15,16,108-110]. 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 açtığını gösteren ilk çalışmadır.

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. Bu çalışmada *MTHFR* gen promotorunda 18 CpG adası incelenmiştir. Buradaki çalışmada ise incelenen CpG adası sayısı sadece 3'tür. Bunun nedeni sekanslanan gen bölgesinin pyrosekanslamanın kısıtlılığı nedeniyle 100 nükleotidden uzun tutulamamasıdır.

Bizim çalışmamızda Wu'nun çalışmasından farklı olarak *MTHFR* gen promotoru hipermetilasyonu normal sperm sayı ve kalitesi olan erkeklerde de fertil kontrollere nazaran anlamlı derecede daha sık izlenmiştir. Wu ve arkadaşları *MTHFR* gen promotoru hipermetilasyonunu sadece hasta alt grup-b olarak adlandırdıkları oligoastenoteratozoospermik grupta anlamlı derecede artmış olarak izlemiş, alt grup-a olarak adlandırılan normozoospermik erkeklerde böyle bir artış izlememişlerdir. Bizim sonuçlarımızı Wu ve arkadaşlarının aksine bulmamız hasta seçim kriterlerinin farklı olmasından ileri geliyor olabilir. Zira, bildiğimiz kadarıyla sperm epigenetiği bu kadar iyi tanımlanmış bir açıklanamayan infertilite grubunda ve özellikle de böyle kötü prognostik bir alt grupta ilk kez çalışılmıştır.

Bu çalışma, ısrarla bir neden bulunamadığı ve kötü prognostik açıklanamayan infertilitede sperm epigenetiğinin göz ardı edilemeyecek önemde olduğuna dikkat çekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada normal kalitede spermde *MTHFR* gen promotoru hipermetilasyonu ilk kez idiyopatik infertilite ile ilişkili bulunmuştur. *MTHFR* geninin, çevresel ya da bireysel faktörler nedeniyle, epigenetik olarak sessizleştirilmesi DNA'da global olarak hem sentez hem de metilasyon bozukluğuna yol açabilir. Bu da spermatogenez henüz etkilenmemişken, bozuk gametin erken embriyogenezdeki başarısızlığı nedeniyle, infertiliteye yol açabilir.

Daha önce spermde *MTHFR* gen promotoru hipermetilasyonu ile açıklanamayan infertilite arasında bir ilişki bulunamazken bizim bulmuş olmamız büyük olasılıkla seçtiğimiz hasta grubunun tedaviye dirençli uzun süreli kötü prognostik özel bir açıklanamayan infertilite alt grubu olmasından kaynaklanmaktadır.

Gebelikle korelasyonu bulunan spermiogram, ovulasyon ve tubal geçiş testleri normal olan gerçek açıklanamayan infertilite olgularında spontan gebelik oranları seçilmiş gruplarda %80'e yaklaştığından halen 3 yıla kadar beklenmesi tavsiye edilmektedir. Bu olgulara, sadece parenteral ajanlarla yapılan 3 başarısız ovulasyon indüksiyonu ve intrauterin inseminasyon siklusu sonrasında YÜT önerilir. Hem zaman hem de para tasarrufu yapmak adına bir çifti en az 2 yıl daha bekletmeden önce erkek infertilite nedenlerini daha detaylı araştırmak yerinde olacaktır.

Tedaviye dirençli açıklanamayan infertilite olgularında erkek faktörler yeni araştırmalara konu edilecek kadar önemlidir. Biz çalışmamızda *MTHFR* gen promotorunun sperm DNA'sında, belki geçici ama fertilitiyi kesinlikle etkileyecek düzeyde, epigenetik programlanmaya uğradığını tespit ettik.

Daha fazla olgu sayılarında daha ileri teknikler ile yapılacak çalışmalar açıklanamayan infertilitede epigenetiğin yerini aydınlayabileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. , T. A., Potdar, N., Jevé, Y. B. ve Nardo, L. G. (2014). Definition and Epidemiology of Unexplained Infertility. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 69(2), 109-115.
2. Gunn, D. D. ve Bates, G. W. (2016). Evidence-based approach to unexplained infertility: a systematic review. *Fertility and Sterility*, Şubat, pii:S0015-0282(16)00085-6.
3. Gleicher, N., Barad, D. (2006). Unexplained infertility: Does it really exist? *Human Reproduction*, 21 (8), 1951–1955.
4. Sadeghi, M. R. (2015). Unexplained Infertility, the Controversial Matter in Management of Infertile Couples. *Journal of Reproduction and Infertility*, 16(1), Editörün yazısı.
5. Esteves, S. C., Hamada, A., Kondray, V., Pitchika, A., Agarwal, A. (2012). What every gynecologist should know about male infertility: an update. *Archives on Gynecology and Obstetrics*, 286, 217–229.
6. Björndahl, L. (2011). What is normal semen quality? On the use and abuse of reference limits for the interpretation of semen analysis results. *Human Fertility*, 14(3), 179–186.
7. Dada, R., Kumar, M., Jesudasan, R., Fernández, J. L., Gosálvez, J. ve Agarwal, A. (2012). Epigenetics and its role in male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29, 213–223.
8. Gannon, J. R., Emery, B. R., Jenkins, T. G., Carrell, D. T. (2014). The sperm epigenome: implications for the embryo. *Advanced Experiments in Medical Biology*, 791, 53–66.
9. Hammoud, S. S., Nix, D. A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D. T. ve Cairns, B. R. (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature*, 460, 473–78.
10. Carrell, D. T. ve Hammoud, S. S. (2010). The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Molecular Human Reproduction*, 16, 37–47.
11. Hammoud, S. S., Nix, D. A., Hammoud, A. O., Gibson, M., Cairns, B. R. ve Carrell, D. T. (2011). 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*, 26, 2558–69.
12. Rajender, S., Avery, K. ve Agarwal, A. (2011). Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research*, 727, 62-71.

13. Riggs, A. D., Martienssen, R. A. ve Russo V. E. A. (1996). In Epigenetic mechanisms of gene regulation. *Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, giriş.
14. Krausz, C., Sandoval, J., Sayols, S., Chianese, C., Giachini, C., Heyn, H. ve Esteller, M. (2012). Novel Insights into DNA Methylation Features in Spermatozoa: Stability and Peculiarities. *PLOS One*, 7(10): e44479.
15. Khazamipour, N., Noruzinia, M., Fatehmanesh, P., Keyhanee, M. ve Pujol, P. (2009). MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. *Human Reproduction*, 24(9), 2361–2364.
16. Wu, W., Shen, O., Qin, Y., Niu, X., Lu, C., Xia, Y., Song, L., Wang, S. ve Wang, X. (2010). Idiopathic Male Infertility Is Strongly Associated with Aberrant Promoter Methylation of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR). *PLOS One*, 5(11), e13884.
17. Singh, K. ve Jaiswal, D. (2012). One-Carbon Metabolism, Spermatogenesis, and Male Infertility. *Reproductive Sciences*, 20(6) 622-630.
18. Chen, Z., Karaplis, A. C., Ackerman, S. L., ve ark. (2001) Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Human Molecular Genetics*, 10(5), 433-443.
19. Gupta, N., Gupta, S., Dama, M., ve ark. (2011). 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*, 6(7), e22277.
20. Safarinejad, M. R., Shafiei, N. ve Safarinejad, S. (2011). Relationship between genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (C677T, A1298C, and G1793A) as risk factors for idiopathic male infertility. *Reproductive Sciences*, 18(3), 304-315.
21. Montjean, D., Benkhalifa, M., Dessolle, L. ve ark. (2011). Polymorphisms in MTHFR and MTRR genes associated with blood plasma homocysteine concentration and sperm counts. *Fertility and Sterility*, 95(2), 635-640.
22. Jarow, J. P., Sharlip, I. D., Belker, A. M., Lipshultz, L. I., Sigman, M., Thomas, A. J. ve ark. (2002). Best practice policies for male infertility. *Journal of Urology*, 167(5), 2138–2144.
23. Gianotten, J. M. P., Lombardi, A. H., Zwinderman, R. J., Lilford, F. van der Veen. (2004). Idiopathic impaired spermatogenesis: genetic epidemiology is unlikely to provide a short-cut to better understanding. *Human Reproduction Update*, 10, 533–539.
24. Carone, B. R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J. M., Hart, C. E., Li, R., ve ark. (2010). Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell*, 143, 1084–96.

25. Ziller, M. J., Muller, F., Liao, J., Zhang, Y., Gu, H., Bock, C., ve ark. (2011). Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genetics*, 7, e1002389.
26. Gardiner-Garden, M. ve Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes, *Journal of Molecular Biology*, 2, 261–282.
27. Takai, D. ve Jones, P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 3740–3745.
28. Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S. W., Chen, H., Henderson, I. R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S. E. ve Ecker, J. R. (2006). Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis. *Cell*, 126, 1189–1201.
29. Liyanage, V. R., Jarmasz, J. S., Murugesan, N., Del Bigio, M. R., Rastegar, M. ve Davie, J. R. (2014). DNA modifications: function and applications in normal and disease States. *Biology (Basel)*, 3, 670–723.
30. Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C. L., Zhang, X., Golic, K. G., Jacobsen, S. E. ve Bestor, T. H. (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 311, 395–398.
31. Nimura, K., Ishida, C., Koriyama, H., Hata, K., Yamanaka, S., Li, E., Ura, K. ve Kaneda, Y. (2006). Dnmt3a2 targets endogenous Dnmt3L to ES cell chromatin and induces regional DNA methylation. *Genes Cells*, 11, 1225–12237.
32. Wang, X. X., Sun, B. F., Jiao, J., Chong, Z. C., Chen, Y. S., Wang, X. L., ve ark. (2015). Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine modification pattern is a novel epigenetic feature of globozoospermia. *Oncotarget*, 6, 6535–43.
33. Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S. A., Kim, Y., Allis, C. D. ve Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by polycomb and HP1 chromodomains, *Genes Development*, 17, 1870–1881.
34. Stuppia, L., Franzago, M., Ballerini, P., Gatta, V. ve Antonucci, I. (2015). Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. *Clinical Epigenetics*, 7, 120.
35. Havas, K., Flaus, A., Phelan, M., Kingston, R., Wade, P. A., Lilley, D. M. ve Owen-Hughes, T. (2000). Generation of superhelical torsion by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell*, 103, 1133–1142.
36. Varga-Weisz, P. (2001). ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions. *Oncogene*, 20, 3076–3085.
37. Janscak, P. ve Bickle, T. A. (2000). DNA supercoiling during ATP-dependent DNA translocation by the type I restriction enzyme. EcoAI, *Journal of Molecular Biology*, 295, 1089–1099.

38. Kim, T. K., Ebright, R. H. ve Reinberg, D. (2000). Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIH. *Science*, 288, 1418–1422.
39. Carrell, D. T. (2012). Epigenetics of the male gamete. *Fertility and Sterility*, 97(2), 267-274.
40. Adenot, P. G., Mercier, Y., Renard, J. P. ve Thompson, E. M. (1997). Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development*, 124(22), 4615–25.
41. Santos, F., Hendrich, B., Reik, W. ve Dean, W. (2002). Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Developmental Biology*, 241(1), 172–82.
42. Oakes, C. C., La Salle, S., Smiraglia, D. J., Robaire, B. ve Trasler, J. M. (2007). A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(1), 228–33.
43. Yanagimachi, R. (2005). Male gamete contributions to the embryo. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1061, 203–7.
44. Kuretake, S., Kimura, Y., Hoshi, K. ve Yanagimachi, R. (1996). Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biology of Reproduction*, 55(4), 789-95.
45. Tanphaichitr, N., Sobhon, P., Taluppeth, N. ve Chalermisarachai, P. (1978) Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Experimental Cell Research*, 117, 347–356.
46. Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thevenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S. ve Caron, C. (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *Journal of Cell Biology*, 176, 283–294.
47. Gardiner-Garden, M., Ballesteros, M., Gordon, M. ve Tam, P. P. (1998). Histone- and protamine– DNA association: conservation of different patterns within the betaglobin domain in human sperm. *Molecular Cellular Biology*, 18, 3350–3356.
48. Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M. ve Steger, K. (2002). Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia*, 34, 384–390.
49. Rousseaux, S., Gaucher, J., Thevenon, J., Caron, C., Vitte, A. L., Curtet, S. ve ark. (2009). Spermiogenesis: histone acetylation triggers male genome reprogramming. *Gynecology Obstetrics and Fertility*, 37, 519–22.

50. Nair, M., Nagamori, I., Sun, P., Mishra, D. P., Rheaume, C., Li, B. ve ark. (2008). Nuclear regulator Pygo2 controls spermiogenesis and histone H3 acetylation. *Developmental Biology*, 320, 446–55.
51. Rousseaux, S., Boussouar, F., Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Curtet, S. ve ark. (2011). Molecular models for post-meiotic male genome reprogramming. *Systematic Biology of Reproductive Medicine*, 57, 50–53.
52. Song, N., Liu, J., An, S., Nishino, T., Hishikawa, Y. ve Koji, T. (2011). Immunohistochemical analysis of histone H3 modifications in germ cells during mouse spermatogenesis. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 44, 183–90.
53. Rousseaux, S., Caron, C., Govin, J., Lestrat, C., Faure, A. K. ve Khochbin, S. (2005). Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene*, 345, 139–153.
54. Aoki, V. W., Liu, L. ve Carrell, D. T. (2005). Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Human Reproduction*, 20, 1298–1306.
55. Marushige, Y. ve Marushige, K. (1975) Transformation of sperm histone during formation and maturation of rat spermatozoa. *Journal of Biology Chemistry*, 250, 39–45.
56. Calvin, H. I. ve Bedford, J. M. (1971). Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *Journal of Reproduction Fertility and Supplements*, 13, 65–75.
57. Yelick, P. C., Balhorn, R., Johnson, P. A., Corzett, M., Mazrimas, J. A., Kleene, K. C. ve Hecht, N. B. (1987). Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not. *Molecular Cellular Biology*, 7, 2173–2179.
58. Antonucci, I., Di Pietro, R., Alfonsi, M., Centurione, M. A., Centurione, L., Sancilio, S., ve ark. (2014). Human second-trimester amniotic fluid cells are able to create embryoid body-like structures “in vitro” and to show typical expression profiles of embryonic and primordial germ cells. *Cell Transplantation*, 23, 1501–15.
59. Bottomley, M. J. (2004). Structures of protein domains that create or recognize histone modifications. *EMBO Reports*, 5, 464–469.
60. Oakes, C. C., la Salle, S., Smiraglia, D. J., Robaire, B. ve Trasler, J. M. (2007). Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Developmental Biology*, 307, 368–79.
61. Boissonnas, C. C., Jouannet, P. ve Jammes, H. (2013). Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertility and Sterility*, 99, 624–31.
62. Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M. ve Steger, K. (2002). Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia*, 34, 384–90.

63. Oliva, R. ve Mezquita, C. (1986). Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core particles in vitro. *Biochemistry*, 25, 6508–11.
64. McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology*, 262(1), 1–15.
65. Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M. ve Matsui, Y. (2005). Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Developmental Biology*, 278(2), 440–58.
66. Payne, C. ve Braun, R. E. (2006). Histone lysine trimethylation exhibits a distinct perinuclear distribution in Plzf-expressing spermatogonia. *Developmental Biology*, 293(2), 461–72.
67. Peters, A. H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M. ve Jenuwein, T. (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*, 107(3), 323–37.
68. Namekawa, S. H., Park, P. J., Zhang, L. F., Shima, J. E., McCarrey, J. R., Griswold, M. D. ve Lee, J. T. (2006). Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice. *Current Biology*, 16(7), 660–667.
69. Turner, J. M., Mahadevaiah, S. K., Ellis, P. J., Mitchell, M. J. ve Burgoyne, P. S. (2006). Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Development Cell*, 10(4), 521–9.
70. Martianov, I., Brancorsini, S., Catena, R., Gansmuller, A., Kotaja, N., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P. ve Davidson, I. (2005). Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8), 2808–13.
71. Zhu, B., Zheng, Y., Pham, A. D., Mandal, S. S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. ve Reinberg, D. (2005). Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Molecular Cell*, 20, 601–611.
72. Drabent, B., Bode, C. ve Doenecke, D. (1993). Structure and expression of the mouse testicular H1 histone gene (H1t). *Biochemistry Biophysics Acta*, 1216, 311–313.
73. Iguchi, N., Tanaka, H., Yomogida, K. ve Nishimune, Y. (2003). Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. *International Journal of Andrology*, 26, 354–365.

74. Gatewood, J. M., Cook, G. R., Balhorn, R., Schmid, C. W. ve Bradbury, E. M. (1990). Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *Journal of Biology and Chemistry*, 265, 20662–20666.
75. Bramlage, B., Kosciessa, U. ve Doenecke, D. (1997). Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation*, 62, 13–20.
76. Tachiwana, H., Osakabe, A., Kimura, H. ve Kurumizaka, H. (2008). Nucleosome formation with the testis-specific histone H3 variant, H3t, by human nucleosome assembly proteins in vitro. *Nucleic Acids Research*, 36, 2208–18.
77. Tachiwana, H., Kagawa, W., Osakabe, A., Kawaguchi, K., Shiga, T., Hayashi-Takanaka, Y., ve ark. (2010). Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 10454–9.
78. Barlow, D. P. (2011). Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model. *Annual Reviews on Genetics*, 45, 379–403.
79. Constância, M., Kelsey, G. ve Reik, W. (2004). Resourceful imprinting. *Nature*, 432, 53–7.
80. Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. ve Haaf, T. (2000). Embryogenesis: demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 403, 501–2.
81. Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R. ve ark. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current Biology*, 10, 475–78.
82. Rougier, N., Bourc'his, D., Gomes, D. M., Niveleau, A., Plachot, M., Pàldi, A. ve ark. (1998). Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Development*, 12, 2108–13.
83. Konaç, E., Önen, H., Sözen, S. (2010). Üroonkolojide MikroRNA (miRNA)'ların yeri ve önemi. *Üroonkoloji Bülteni*, 1, 3-13.
84. Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431 (7006), 350-55.
85. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116 (2), 281-97.
86. Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. ve Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432 (7014), 235-40.
87. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. ve Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303 (5654), 95-8.

88. Rotondo, J. C., Bosi, S., Bazzan, E., Di Domenico, M., De Mattei, M., Selvatici, R., Patella, A., Marci, R., Tognon, M. ve Martini, F. (2012). Methylenetetrahydrofolate reductase gene promoter hypermethylation in semen samples of infertile couples correlates with recurrent spontaneous abortion. *Human Reproduction*, 27(12), 3632–3638.
89. Razin, A. ve Riggs, A. D. (1980). DNA methylation and gene function. *Science*, 210, 604–10.
90. Xiong, Z. ve Laird, P. W. (1997). COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Research*, 25, 2532–34.
91. Eads, C. A., Danenberg, K. D., Kawakami, K., Saltz, L. B., Blake, C., Shibata, D. ve ark. (2000). MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 28, E32.
92. Dupont, J. M., Tost, J., Jammes, H. ve Gut, I. G. (2004). De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal. of Biochemistry*, 333, 119–27.
93. Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W. ve ark. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 1827–31.
94. Mardis, E. R. (2011). A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*, 470, 198–203.
95. Laird, P. W. (2010). Principles and challenges of genome wide DNA methylation analysis. *Nature Reviews of Genetics*, 11, 191–203.
96. França, L. T., Carrilho, E. ve Kist, T. B. (2002). A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(2), 169-200.
97. Szeberényi, J. (2013). Problem-solving test: pyrosequencing. *Biochemical Molecular Biology Education*, 41(2), 112-5.
98. Ferlin, A., Raicu, F., Gatta, V., Zuccarello, D., Palka, G. ve Foresta, C. (2007). Male infertility: role of genetic background. *Reproductive Biomedicine Online*, 14, 734–45.
99. Esteves, S. C. (2013). A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 6, 176–82.
100. Huang, Y., Wang, Y., Wang, M., Sun, B., Li, Y., Bao, Y., Tian, K. ve Xu, H. (2008). Differential methylation of TSP50 and mTSP50 genes in different types of human tissues and mouse spermatogenic cells. *Biochemistry and Biophysical Research Communications*, 374, 658–661.
101. Flanagan, J. M., Pependikyte, V., Pozdniakovaite, N., Sobolev, M., Assadzadeh, A. ve ark. (2006). Intra- and inter-individual epigenetic variation in human germ cells. *American Journal of Human Genetics*, 79(1), 67–84.

102. Hartmann, S., Bergmann, M., Bohle, R. M., Weidner, W. ve Steger, K. (2006). Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 12(6), 407–411.
103. Marques, C. J., Carvalho, F., Sousa, M. ve Barros, A. (2004). Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet*, 363(9422), 1700–1702.
104. Manning, M., Lissens, W., Liebaers, I., Van Steirteghem, A. ve Weidner, W. (2001). Imprinting analysis in spermatozoa prepared for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *International Journal of Andrology*, 24(2), 87–94.
105. Barlow, D. P. (2011). Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model. *Annual Reviews on Genetics*, 45, 379–403.
106. Houshdaran, S., Cortessis, V. K., Siegmund, K., Yang, A., Laird, P. W. ve Sokol, R. Z. (2007). Widespread Epigenetic Abnormalities Suggest a Broad DNA Methylation Erasure Defect in Abnormal Human Sperm. *PLoS ONE*, 2(12), e1289.
107. Navarro-Costa, P., Nogueira, P., Carvalho, M., Leal, F., Cordeiro, I., Calhaz-Jorge, C. ve ark. (2010). Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm. *Human Reproduction*, 25, 2647–54.
108. Kobayashi, H., Sato, A., Otsu, E., Hiura, H., Tomatsu, C., Utsunomiya, T. ve ark. (2007). Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Human Molecular Genetics*, 16, 2542–51.
109. Marques, C. J., Costa, P., Vaz, B., Carvalho, F., Fernandes, S., Barros, A. ve ark. (2008). Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Molecular Human Reproduction*, 14, 67–74.
110. Poplinski, A., Tüttelmann, F., Kanber, D., Horsthemke, B. ve Gromoll, J. (2010). Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. *International Journal of Andrology*, 33, 642–49.

EKLER

EK-1. Çalışmaya katılanlar için doldurulan bilgi formu

Eşine ait gösterilebilen bir faktör olmayacak

18-40 yaş arasında olacak

2-7 gün perhiz süresi

Ciddi oligoastenoteratozoospermi olmayacak (TMSS>5 M)

Bilinen bir genetik hastalık taşıyıcısı ya da sahibi olmayacak

Genital sistemi etkileyen ateşli ya da inflamatuvar bir hastalığı olmayacak

Genetik belirteçleri etkileyebilecek bir ilaç kullanmayacak (L-Karnitin, E-vit gibi)

Kronik bir hastalığı olmayacak

Gönüllü Adı:

Doğum Tarihi:

Telefon:

Adres:

IVF Endikasyonu: Açıklanamayan / Diğer

Eşinin D.T. :

PCOS: + / - BMI:

Anatomik F. Faktör: + / -

Sperm sayısı:

Sperm Motilitesi:

Sperm Morfolojisi:

Özgeçmiş (Hastalıklar/Alışkanlıklar):

İlaç Kullanımı:

Önceki Tedaviler:

IVF Sayısı:

IVF Protokolü:

EK-2. Etik onay formu

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU		
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara
	TELEFON	0312 202 69 58
	FAKS	0312 202 46 73
	E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

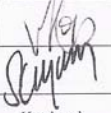
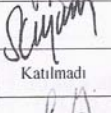
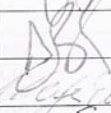
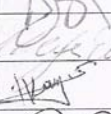
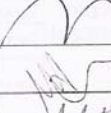
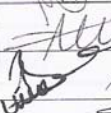
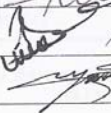
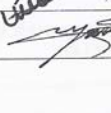
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Açıklanamayan İnfertilitede Sperm Epigenetik Değişiklikleri				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Ece KONAÇ				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI /UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. / G.Ü.T.F.				
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)					
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya,mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle veya rtin muayene tetkik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar -I-Doktora/Tezi				
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☒	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver.No	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐		
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐		
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	☒	Açıklama			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒				
	BIYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU	☐				
	DİĞER	☐				

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 210	Toplantı tarihi: 25.11.2013
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve "bütçesi dışında" uygun bulunmuş olup araştırmanın dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına G.Ü.Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.	

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik (13.04.2013), İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Canan ULUOĞLU

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji A.D	G.Ü.T.F	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Uzm.Dr.Cemal GÜVERCİN BAŞKAN YARD.	Tıp Etiği	Y.mah. Prof.Dr. Yunus Müftü ACS/AP Merk.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji A.D	G.Ü.T.F	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

EK-2. (devam) Etik onay formu

Prof.Dr.Bülent BOYACI ÜYE	Kardiyoloji A.D	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Sefer AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı A.D	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Mehmet Akif ÖZTÜRK ÜYE	İç Hastalıkları A.D	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Elvan İŞERİ ÜYE	Çocuk Psikiyatrisi A.D	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Arzu BAKIRTAŞ ÜYE	Çocuk Sağlığı ve Hast.A.D	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Nilüfer TURAN DURAL ÜYE	Farmakoloji A.D	G.Ü.E.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Hakan KAYIR ÜYE	Tıbbi Farmakoloji A.D	G.A.T.A	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Mustafa ARSLAN ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Murat AKIN ÜYE	Genel Cerrahi A.D	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Sercan AKSOY ÜYE	İç Hastalıkları A.D	H.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Av.Arzu BUZKIRAN KAYA ÜYE	Avukat	G.Ü.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Emine ŞEKER ÜYE	Sivil Temsilci	-	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Zayıfoğlu Karaca, Müjdegül
Uyruğu : TC
Doğum tarihi ve yeri : 29/01/1981, Ankara
Medeni hali : Evli, 2 çocuk annesi
Telefon : 0505 740 6504
Faks : 0312 565 6032
e-mail : dr_mujdegul@hotmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Uzmanlık	Kadın Hastalıkları ve Doğum	2010
Lisans	Tıp Fakültesi	2004
Lise	Fen Lisesi	1998

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2005-2010	Ankara Dr Zekai Tahir Burak Kadın Hastanesi	Asistan Doktor
2010-2012	Konya Cihanbeyli Devlet Hastanesi	Uzman Doktor
2012-2013	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanseri Dairesi	Uzman Doktor
2013-halen	Ankara Dr Zekai Tahir Burak Kadın Hastanesi	Başasistan
2013-halen	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanseri Dairesi	Geçici Görevlendirme

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Gungor T, Kanat-Pektas M, Ozat M, Zayifoglu Karaca M. A systematic review: endometriosis presenting with ascites. Arch Gynecol Obstet. 2011 Mar;283(3):513-8.
2. Ozat M, Altinkaya SO, Gungor T, Cağlar M, Zergeroglu S, Karaca M, Besli M, Mollamahmutoglu L. Extraovarian conditions mimicking ovarian cancer: a single center experience of 15 years. Arch Gynecol Obstet. 2011 Sep;284(3):713-9.
3. Yilmaz I, Erkeköl FO, Celen S, Karaca MZ, Aydın O, Celik G, Misirligil Z, Mungan D. Does drug compliance change in asthmatic patients during pregnancy? Multidiscip Respir Med. 2013 Jun 11;8(1):38.
4. Baser E, Erkilinc S, Esin S, Togrul C, Biberoglu E, Karaca MZ, Gungor T, Danisman N. Adnexal masses encountered during cesarean delivery. Int J Gynaecol Obstet. 2013 Nov;123(2):124-6.
5. Uzunlar Ö, Özyer Ş, Başer E, Toğrul C, Karaca M, Güngör T. A survey on human papillomavirus awareness and acceptance of vaccination among nursing students in a tertiary hospital in Ankara, Turkey. Vaccine. 2013 Apr 19;31(17):2191-5.
6. Mollamahmutoglu L, Uzunlar O, Kahyaoglu I, Ozyer S, Besli M, Karaca M. Assessment of the sexually abused female children admitted to a tertiary care hospital: Eight year experience. Pak J Med Sci. 2014 Sep;30(5):1104-7.
7. Turcpar AF, Kadioğlu N, Aslan E, Tunc S, Zayıfoğlu M, Mollamahmutoglu L. Sociodemographic and clinical features of postpartum depression among Turkish women: a prospective study. BMC Pregnancy Childbirth. 2015 May 3;15:108.
8. Müjdegül Zayıfoğlu, Erkan Akan, Perran Möröy, Nurten Tarlan. Düşük Doz Klomifen Sitrat Kullanımı ile Gelişen Oveyan Hiperstimülasyon Sonucu Oluşan Over Torsiyonu. Jinekoloji – Obstetrik ve Neonatoloji. 2007, 4(14):528-31.
9. Müjdegül Zayıfoğlu Karaca, Cihan Toğrul, Özlem Altinkaya, Eralp Başer, Ebru H. Biberoglu, Levent Şirvan, Tayfun Güngör. Vajinanın Primer Malign Melanomu: Vaka Sunumu. Jinekoloji – Obstetrik ve Neonatoloji. 2012, 9 (35):1464- 1466.
10. Müjdegül Zayıfoğlu Karaca, Ebru H. Biberoglu, Cihan Toğrul, Eralp Başer, Özlem Altinkaya, Oğuz Devrim Yardımcı, Esin Merve Erol, Tayfun Güngör. İleri Evre Over Kanseri Taklit Eden Gossipiboma Olgusu. Jinekoloji – Obstetrik ve Neonatoloji. 2012, 9 (35):1467- 1468.
11. Müjdegül Zayıfoğlu Karaca, Oğuz Devrim Yardımcı, Eralp Başer, Serap Akbay, Gülnur Gürel, Tayfun Güngör. Perimenapozal Anormal Uterin Kanama Olan bir Hastada

Tespit Edilen Primer Odağı Belirlenemeyen Müsinöz Adenokarsinom Olgusu. Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi. 2013, 16(1); 15-17.

12. Müjdegül Zayıfoğlu Karaca, Cihan Toğrul, Eralp Başer, Bülent Özdal, Tayfun Güngör. Serviks Karsinomu ve Yüksek Dereceli Skuamoz İntraepitelyal Lezyonlarda Serum Folat, Vitamin B12, Homosistein ve Eser Element Düzeyleri. Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi. 2013, 16(2); 39-43.

13. Müjdegül Zayıfoğlu Karaca, Oğuz Devrim Yardımcı, Eralp Başer, Cihan Toğrul, Hatice Bayramoğlu, Tayfun Güngör. Gebelikte Overyan İmmatür Teratom: Olgu Sunumu. Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi. 2012, 15(4); 116-118.

14. Müjdegül Zayıfoğlu Karaca, Ezgi Hacıkamiloğlu, Murat Gültekin. Serviks Kanseriinde Human Papilloma Virüs DNA Taramasının Türkiye için Önemi. Türkiye Klinikleri Jinekoloji Obstetrik Özel Dergisi, Jinekolojik Onkolojide Güncel Yaklaşımlar Özel Sayısı-I. 2015, 8(1); 84-88.

Sunum ve konuşmalar

Ulusal ve uluslar arası bilimsel toplantılarda toplam 43 sözel bildiri ve poster sunumu ile 11 konuşma yapılmıştır.

Hobiler

Kitap okumak (inceleme), sinema (bilim-kurgu, romantik), günlük tutmak, kitap yazmak, seyahat etmek, spor yapmak (spinning, fitness, snowboard).



GAZİ GELECEKTİR..