

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞUMSAL TEK YA DA ÇİFT TARAFLI VAS DEFERENS
YOKLUĞU OLAN ERKEK İNFERTİL KİŞİLERDE AZOOSPERMİ
FAKTÖR VE KİSTİK FİBROZİS GEN MUTASYONLARININ
İNCELENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Müge Gülcihan ÖNAL**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Temmuz 2008
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞUMSAL TEK YA DA ÇİFT TARAFLI VAS DEFERENS
YOKLUĞU OLAN ERKEK İNFERTİL KİŞİLERDE AZOOSPERMİ
FAKTÖR VE KİSTİK FİBROZİS GEN MUTASYONLARININ
İNCELENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Müge Gülcihan ÖNAL**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TSY-08-338 nolu
proje ile desteklenmiştir**

**Temmuz 2008
KAYSERİ**

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL danışmanlığında **Müge Gülcihan ÖNAL** tarafından hazırlanan “**Doğumsal Tek ya da Çift Taraflı Vas Deferens Yokluğu Olan Erkek İnfertil Kişilerde Azoospermi Faktör ve Kistik Fibrozis Gen Mutasyonlarının İncelenmesi**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Genetik** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

12/08/2008

JÜRİ :

İmza

Başkan : Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Üye : Doç. Dr. Oğuz EKMEKÇİOĞLU

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

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

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde bilgi, deneyim ve yardımlarıyla beni yönlendiren, sabır ve desteğini hiç esirgemeyen değerli hocam, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi tez yöneticim sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL' a,

Yakın ilgi, yardım ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Doç. Dr. Oğuz EKMEKÇİOĞLU'na ,

Uyumlu bir çalışma ortamı sağlayıp, manevi desteklerini her zaman hissettiğim Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri, sayın Prof. Dr. Munis DÜNDAR ve sayın Yrd. Doç. Dr. Çetin SAATÇI' ye,

Çalışmamın her aşamasında manevi desteklerini ve güler yüzlerini hiçbir zaman esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Serpil Taheri, Hilal Akalın, Hülya Şıvgın ve diğer adını sayamadığım Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına

Sevgi ve destekleriyle hayatımın her aşamasında her zaman yanımda olan eşime ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**DOĞUMSAL TEK YA DA ÇİFT TARAFLI VAS DEFERENS YOKLUĞU OLAN ERKEK
İNFERTİL KİŞİLERDE AZOOSPERMİ FAKTÖR VE KİSTİK FİBROZİS GEN
MUTASYONLARININ İNCELENMESİ**

ÖZET

Y kromozomu delesyonları ve kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) geni mutasyonları erkek infertilitesinde rol oynayan genetik anomalilerin başında yer almaktadır. Özellikle Y kromozomunun uzun kolundaki (Yq) azoospermi faktör (AZF) bölgesinin delesyonları spermatogenezini engelleyerek non-obstrüktif azoospermiye, CFTR gen mutasyonları ise vas deferens agenezisine neden olarak obstrüktif azoospermiye yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir.

Bu çalışmada; vas deferens agenezisi olan hastalarda AZF ve CFTR gen mutasyonlarının araştırılması amaçlanmıştır. 29'u çift, 15'i tek taraflı vas deferens agenezisi olan hastaların periferik kan örneklerinden kromozom analizi ve DNA izolasyonu yapıldı. AZF gen delesyonlarını tespit etmek için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yapıldı. AZF a, b ve c bölgelerinden ikişer adet sequence-tagged- sites (STS) bölgesi ve kontrol olarak da SRY ve ZFY bölgeleri kullanıldı. Kullanılan STS bölgeleri: AZF a için, sY84 ve sY86; AZF b için, sY127 ve sY134; AZF c için ise, sY254 ve sY255 idi. Çalışmamızda vas deferens agenezisi olan hiçbir hastada kromozom anomalisi ve AZF delesyonu tespit edilmedi.

CFTR geni için ise, tarama kiti kullanılarak en sık görülen 19 mutasyona bakıldı. Sadece üç hastada (%6,98) mutasyon tespit edildi. Çift taraflı vas deferens agenezisi olan iki hastada I148T, bir hastada da N1303K mutasyonu heterozigot olarak bulundu (% 10). Tek taraflı vas deferens agenezisi olan hastalarda ise mutasyon rastlanılmadı.

Sonuç olarak, vas deferens agenezisi olan hastalarda kromozom analizi ve AZF gen delesyonlarına bakılmasının çok gerekli olmadığı, fakat çift taraflı vas deferens agenezisi olan hastalarda CFTR gen mutasyonlarının araştırılmasının önemli olduğu kanısındayız. Ayrıca CFTR geninde mutasyon çıkan hastaların eşlerinin de araştırılıp, eşinde de mutasyon çıktığı takdirde doğacak çocukların kistik fibrozis olma olasılığının artacağı bildirilmelidir.

Anahtar kelimeler: Doğumsal vas deferens yokluğu, AZF, erkek infertilitesi, CFTR

**THE ANALYZE OF AZOOSPERMIA FACTOR AND CYSTIC FIBROSIS GENE
MUTATIONS IN MALE INFERTILE INDIVIDUALS WITH CONGENITAL
UNILATERAL OR BILATERAL VAS DEFERENS AGENESIS**

ABSTRACT

Y chromosome microdeletions and Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) gene mutations are the genetic abnormalities which play role in male infertility. It is shown in many studies that especially Azoospermia Factor (AZF) regions on long arm of Y chromosome lead to non-obstructive azoospermia by preventing spermatogenesis and CFTR gene mutations lead to obstructive azoospermia by causing congenital vas deferens agenesis. The aim of this study is to investigate the AZF and CFTR gene mutations in patients who had vas deferens agenesis. Peripheral blood samples were taken to examine chromosome analysis and DNA isolation from 44 patients. 29 individuals with bilateral absence of vas deferens and 15 with unilateral absence of the vas deferens were analyzed for AZF deletions and CFTR gene mutations. Four patients with normal cytogenetic findings with CAVD were included in the study. In these patients microdeletion analysis was performed by polymerase chain reaction (PCR) method on DNA extracted from peripheral blood. In each case 6 sequence-tagged sites (STS) in azoospermia factor (AZF) regions were tested: sY84, sY86 (AZFa); sY127, sY134 (AZFb); sY254, sY255 (AZFc) and control primers were SRY and ZFY. There was no deletion in AZF gene. For CFTR mutations, we used screening kit that has been provided to screen common 19 mutations. I148T mutations for CF were found as heterozygous mutation in two patients of CBAVD and N1303K mutations for CF were found as heterozygous mutation in the one patient. No mutations could be patients CUAVD.

According to our study, search for chromosome analysis and AZF gene deletions in patients with have vas deferens agenesis is not very necessary, but search for CFTR gene mutations especially in patients who have bilateral vas deferens agenesis is very important. Furthermore, the wife of the patients who had CFTR gene mutations have to be investigated. Because, if they have gene mutations too, the possibility of being cystic fibrosis for their children will increase.

.Key words: Congenital vas deferens agenesis, AZF, male infertility, CFTR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	I
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 ERKEK İNFERTİLİTESİ.....	3
2.1.1. Y Kromozom Mikrodelesyonları	4
2.1.2. Kromozom Anomalileri	4
2.1.3. Konjenital Vas Deferens Agenezisine Neden Olan Kistik Fibrozis Gen Mutasyonları.....	5
2.1.4. Sperm Fonksiyonlarını Direkt Olarak Etkileyen Genetik Sendromlar	6
2.2. KONJENİTAL VAS DEFERENSLERİN AGENEZİSİ	7
2.2.1. Semen Analizi ve Normal Sperm Parametreleri.....	9
2.3. Y KROMOZOMU VE AZF	10
2.3.1. Y Kromozomu	10
2.3.2. AZF (Azoospermi Faktör)	14
2.3.2.1. AZF a Bölgesi	15
2.3.2.2. AZF b Bölgesi.....	16
2.3.2.3. AZF c Bölgesi	17
2.3.2.4. AZF d Bölgesi.....	18
2.4. Y KROMOZOM MİKRODELESYONLARININ OLUŞ MEKANİZMASI	19

	<u>Sayfa No</u>
2.5. DOĞUŞTAN VAS DEFERENS'İN TEK YA DA ÇİFT TARAFLI YOKLUĞU VE KİSTİK FİBROZİS GENİ	19
2.5.1. Kistik Fibrozis Geni	21
2.5.2. CFTR Gen Mutasyonlarının Oluşum Mekanizmaları.....	24
2.6. POLİMORFİZM.....	25
2.6.1. Genetik Polimorfizm	25
2.6.2. Tıbbi Genetikte Polimorfizmlerin Kullanımı	26
2.7. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR).....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. GEREÇLER.....	31
3.1.1. Demirbaş Malzemeler.....	31
3.1.2. Sarf Malzemeler	32
3.2. YÖNTEMLER.....	33
3.2.1. Hasta Seçimi.....	33
3.2.2. Kan Örneklerinin Toplanması.....	33
3.2.3. Kan Kültür Yöntemi	33
3.2.3.1. Kan Ekimi.....	33
3.2.3.2. Kan Kültür Çıkarımı	34
3.2.3.3. Preparat Hazırlama	34
3.2.3.4. Bantlama	35
3.2.4. Kandan DNA İzolasyonu.....	35
3.2.5. Moleküler Çalışma Basamakları.....	36
3.2.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	36
3.2.5.2. PCR Ürünlerinin Elektroforezi.....	38
3.2.5.2.1. Agaroz Jel Hazırlanması.....	38
3.2.5.2.2. PCR Ürünlerinin Jele Yüklenmesi.....	39
4. BULGULAR.....	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
6. KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Genetik açıdan risk taşıyan gruplar için yapılması önerilen testler	7
Tablo 2.2. WHO kriterlerine göre normal spermiyogram değerleri	9
Tablo 3.1. Y kromozomundaki AZF a, b, c, SRY ve ZFY bölgelerine ait primer dizileri	39
Şekil 2.1. Anormal şekilli spermiler	8
Şekil 2.2. Rekombine olmayan bölgenin (NRY) gen haritası: Y kromozomu, iki terminal ucu	11
Şekil 2.3. Y kromozomu ve sitogenetik bantlaması, AZF bölgeleri	12
Şekil 2.4. AZF bölgeleri	13
Şekil 2.5. 7. Kromozom ve CFTR geni	21
Şekil 2.6. CFTR proteini	23
Şekil 2.7. PCR reaksiyonunun aşamaları	28
Şekil 2.8. Testin prensibi	30
Şekil 4.1. 46,XY Normal erkek karyotipi	42
Şekil 4.2. AZF genlerinin jel elektroforezinde görüntüsü.....	43
Şekil 4.3. Tanı kitinin içinden çıkan strip	44

KISALTMALAR

AZF	: Azoospermi Faktör
CFTR	: Kistik Fibrosis Transmembran Regülatör
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
CAVD	: Congenital Agenesis Vas Deferens
CBAVD	: Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens
CUAVD	: Congenital Unilateral Absence of Vas Deferens
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri
IUI	: İnter Uterin İnseminasyon
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
OAT	: Oligoastenoteratospermi
PABY	: Pseudo oozomal Sınır Bölgesi
SRY	: Sex related Region of Y chromosome
DFFRY	: Drosophila Fat Facets Related Y
DBY	: Dead Box Polypeptide Y
UTY	: Ubiquitous TPR motif on Y
RBM1	: Related Binding Motif of Y
DAZ	: Deleted in Azoospermia
SCOS	: Sertoli Cell Only Sendromu

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, en az bir yıl herhangi bir korunma yöntemi uygulanmaksızın gebeliğin gerçekleşmemesi olarak adlandırılmaktadır.

İnfertil erkeğin değerlendirilmesinde özellikle fertilitiyi etkileyebilecek konulara dikkat edilerek detaylı bir hikaye alınmalıdır. Daha sonra fizik muayenesi yapılarak başlangıç laboratuvar testleri istenir ve temel değerlendirme tamamlanmış olur. Hikaye, fizik muayene ve başlangıç laboratuvar testlerinin sonuçlarına bakılarak, daha spesifik testlere yönlendirilerek ayırıcı tanıya gidilebilir. Her ne kadar, çok sayıda hikaye ve fizik muayene bulgusu azosperminin nedeni hakkında öngörülebilirse de, normal ejakulat volümlü azosperminin etyolojisini saptamada kullanılan esas unsurlar vas deferenslerin bulunması, testis boyutları ve serum FSH'yı içerir. Erkek infertilitesinin farklı yönlerini değerlendiren çok sayıda test bulunmakla birlikte, bütün testleri her hastada kullanmak gerekmez. İlk basamak, vas deferenslerin bulunup bulunmadığına karar vermektir, çünkü konjenital bilateral vas deferens agenizi (CBAVD) ve konjenital unilateral vas deferens agenizi (CUAVD) obstrüktif azosperminin yaygın bir nedenidir. CBAVD ve CUAVD fizik muayeneye dayanan bir klinik tanı olup, CFTR genindeki bozukluktan kaynaklanıyor olabilir. Eğer hikaye, fizik muayene veya laboratuvar çalışmaları spermatogenez bozukluğunu düşündürüyorsa, testis biyopsisi yapılabilir. Testiküler yetmezliğe bağlı azospermi bulunan hastalarda, Klinefelter sendromu gibi kromozom anomalilerini ve Y

kromozomu üzerinde mikrolelesyonları ekarte etmek amacıyla genetik testler yapılmalıdır.

Y kromozom mikrolelesyonları spermatogenetik yetmezlik olgularının önemli bir nedenidir. Y mikrolelesyonlarının sıklığı idiyopatik azospermi olgularında %15–20, şiddetli idiyopatik oligozospermi olgularında ise %7–10 olarak bulunmuştur. Y kromozomunun uzun kolu (Yq) üzerinde, tekrarlayan mikrolelesyonların görüldüğü birbirinden ayrı 3 bölge tanımlanmıştır: Azospermia Factor (AZF) AZF a, AZF b ve AZF c.

İnfertil erkeğin değerlendirilmesindeki hedefler; düzeltilebilir durumların, başka yöntemlerle düzeltilemeyen, ancak erkeğin spermını kullanarak yapılan yardımcı üreme teknikleri (YÜT) ile tedavi edilebilecek nedenlerin, bu tekniklerle de tedavi edilemeyen ve donör inseminasyonu ya da evlat edinmeyi gerektirecek nedenlerin, altta yatan önemli tıbbi patolojilerin hastayı veya çocuğunu etkileyebilecek genetik ve kromozomal bozuklukların belirlenmesine yöneliktir. İdeal olanı, bu değerlendirmelerin infertiliteden sorumlu spesifik bozukluğu ortaya koyabilmesidir. Eğer mümkünse, spesifik bir neden bulunup, buna yönelik spesifik tedaviye başlanılmalıdır. Oysa bilinen bir etiyolojik faktör olmasa bile, gerek deneysel tedavilerden gerekse intrauterin inseminasyon (IUI) ve in vitro fertilizasyon (IVF) gibi YÜT'lerden de fayda görülebilir. Aşırı uzun ve faydası bulunmayan tedavilerden kaçınılarak, infertil çift bu seçenekler hakkında bilgilendirilmelidir.

Bu çalışmada, vas deferens agenezisi olan erkek hastalarda kromozom analizi, AZF gen delesyonları ve CFTR gen mutasyonlarına bakılarak Türk toplumunda infertilitede en sık görülen anomalilerin ve mutasyonların belirlenmesi; hasta ve hasta yakınlarına daha iyi genetik danışma verilerek, hasta için en uygun tedavinin seçilmesine yardımcı olunması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 ERKEK İNFERTİLİTESİ

İnfertilite vakalarının yarısında, erkek üreme yetmezliği ya da disfonksiyonu rol oynar. Erkek infertilitesine yol açan nedenlerin bir kısmı sonradan oluştuğu halde, bir kısmı genetik kökenlidir. Özellikle azospermik ve şiddetli oligospermik hastaların etiyolojilerinde, hem cinsiyet kromozomlarında hem de otozomal kromozomlarda meydana gelen sayısal ve yapısal olan genetik bozukluklar önemli bir yer tutar. Doğal yollarla çocuk sahibi olamayan çiftler günümüzde gelişen intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) gibi yeni teknikler ile sperm faktörüne dayanan infertilitenin üstesinden gelinebilmektedir. Fakat ICSI'den önce her çiftte, çiftlerde mevcut olan genetik hasarın, mevcut infertilitenin ve diğer değişen fenotipik belirtilerin çocuğa geçme riski bakımından bilgi verilmelidir. Bu nedenle böyle erkeklerde, ICSI işleminden önce özellikle karyotip analizi ve Y kromozom mikrolezyonu testleri yapılmalıdır. Semen örneği incelendiğinde sperm içermiyorsa, azospermik olduğu düşünülür. Azoospermik hastalar obstrüktif ve nonobstrüktif azospermi olmak üzere iki kategoriye ayrılır (1). Ejekülatta sperm sayısı 5 milyon/ml altında ise şiddetli oligospermik olarak adlandırılır. Her iki gruptaki hastaların normal yoldan çocuk sahibi olmaları zor olduğu için, bu hastalar özellikle ICSI gibi yardımcı üreme teknikleri ile

daha kolay çocuk sahibi olabilirler. Fakat bu işlemle doğacak çocuklara babadaki genetik hasarın aynen aktarılabileceğinin bildirilmesi gereklidir. Azoospermi ve şiddetli oligospermi ile birlikte görülen genetik bozukluklar sperm yapımını bozarak ya da spermin taşınmasını engelleyerek erkekte infertiliteye neden olabilir. Erkek infertilitesi ile ilgili dört genetik faktör bilinmektedir.

1. İzole spermatogenez defekti yapabilen Y kromozom mikrodelesyonları,
2. Konjenital vas deferens agenezine neden olan kistik fibrozis gen mutasyonları,
3. Testis fonksiyonlarını bozan kromozom anomalileri,
4. Sperm fonksiyonlarını direkt olarak etkileyen genetik sendromlar.

2.1.1. Y Kromozom Mikrodelesyonları

Azoospermik erkeklerin bir kısmında Y kromozomunun uzun kolunda (Yq11) delesyonların saptanması üzerine spermatogenezin bu bölgeden regüle edildiği tahmin edilmiş ve bu bölge azoospermi faktör bölgesi (AZF) olarak tanımlanmıştır (2). AZF bölgesindeki genler yalnız spermatogenezle ilgili genlerdir. Bu nedenle bu bölgedeki delesyonlar fenotipik bozukluk yapmadan izole spermatogenez defektine (şiddetli oligospermi ya da azoospermiye) neden olur. Bugün Y kromozomunun uzun kolu üzerinde, infertil erkekte delesyona uğradığı ve bunlardan her birinin spermatogenezin farklı aşamalarında etkili olduğu gösterilen AZF a, AZF b ve AZF c olmak üzere en az 3 bölgenin varlığı bilinmektedir (3). Bu bölgelerin delesyonları, AZF a, AZF b ve AZF c delesyonları olarak isimlendirilir. Y kromozom mikrodelesyonları spermatogenetik yetmezliğin en sık görülen sebeplerinden biridir. İdiyopatik azoospermide %15–20, idiyopatik oligospermide %7–10 oranında Y kromozom mikrodelesyonlarına rastlanmıştır (4). Bu nedenle nonobstrüktif azoospermili ya da şiddetli oligospermili hastaların hepsine ICSI işleminden önce Y kromozom mikrodelesyon testi yapılmalıdır. Y mikrodelesyonuna sahip erkeklerin tüm erkek çocukları aynı patolojiye sahip olacaklarından, ailelere bu konuda danışmanlık verilmelidir (4-6).

2.1.2. Kromozom Anomalileri

Normal insan somatik hücreleri 22 çift otozom ve 1 çift seks kromozomu olmak üzere total 46 kromozomlu diploid hücrelerdir. Erkekler X ve Y olmak üzere 2 farklı seks kromozomuna sahiptir. Kromozom anomalileri normal popülasyonla yaklaşık %0.5 sıklıkla gözlenmesine rağmen infertil erkeklerde bu oran %5.8' e kadar yükselmektedir

(7). İnfertil bireylerde seks kromozom anomalileri otozomal kromozom anomalilerinden daha sıktır.

Bilindiği gibi kromozom anomalileri sayısal ve yapısal anomaliler olmak üzere ikiye ayrılır (8,9). Yapısal kromozom anomalileri delesyon, inversiyon, kromozomun bir kısmının dublikasyonu ya da bir kromozomun bir parçasının diğer kromozoma translokasyonu şeklinde gerçekleşir. Sayısal kromozom anomalileri, tüm kromozomların multipl kopyalarını içeren hücreler poliploid, bir ya da daha fazla kromozomun bir ilavesini ya da delesyonunu içeren hücreler anoploid olarak sınıflandırılır.

Translokasyonlar normal yeni doğanlara göre infertil erkeklerde 8.5 kat daha fazladır. Benzer şekilde inversiyonlar infertillerde normal popülasyona göre 8 kat fazla görülür (10). Sayısal seks kromozom bozukluğu, erkek infertilitesi vakalarında sık görülen bir durumdur. Klinifelter sendromu, miks gonadal disgenezi ve XYY erkekler bu grup hastalardır. Klinifelter sendromu en sık gözlenen seks kromozom bozukluğudur ve infertil vakalarda 30 kat fazla rastlanır. Azoospermik vakalarda ise %14 oranında rastlanır. ICSI'den sonraki hamileliklerde otozomal trizomi ve seks kromozom anoploidileri daha yüksek görülür. Bu nedenle ICSI işleminden önce hastalarda sayısal veya yapısal bir kromozomal anomalisi saptandığında, genetik danışma ve preimplantasyon genetik teşhis, prenatal genetik teşhis için amniosentez veya koryon villus örnekleme önerilmelidir. Kromozom analizi konvansiyonel yöntemlerle yapılır. Heparinize periferal kan lenfositlerinden 72 saatlik kültür ile metafaz kromozomları elde edilir. Başta Giemsa bantlama (GTG) olmak üzere uygun bantlama yöntemleri ile metafaz kromozomları değerlendirilir.

2.1.3. Konjenital Vas Deferens Agenezisine Neden Olan Kistik Fibrozis Gen Mutasyonları

Kistik fibrozis otozomal resesif geçişli konjenital bir rahatsızlıktır. Kistik fibrozis, Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör (CFTR) genindeki mutasyonlara bağlı olarak gelişir (11).

CFTR geni, iyon kanalı olarak fonksiyon gören bir membran proteinini kodlar ve ejakülatör kanal, seminal vezikül, vas deferens ve epididimisin distal 2/3'ünün oluşumunu da etkiler. Bu nedenle CFTR genindeki mutasyon vas deferens agenezisi ile sonuçlanır. Azoospermik olguların %1,4' ünü oluşturan konjenital vas deferens

agenezili hastaların %85' inde Kistik Fibrozis (CF) gen mutasyonu tanımlanmıştır (12). Şimdiye kadar, 1500'ün üzerinde farklı mutasyon ve sayısız polimorfizm, kistik fibrozisli ya da konjenital bilateral vas deferens agenezili (CBAVD) hastalarda belirlenmiştir. ΔF508 en sıklıkla belirlenen mutasyondur ve Kistik Fibrozisli hastaların en az %50' sinde bulunur (13). Bazı CFTR mutasyonları da konjenital unilateral vas deferens yokluğu ile ilgilidir (14). CBVDA, kistik fibrozisten daha hafif fenotipik özelliklere sahip olmasına rağmen her iki rahatsızlık da CFTR proteininde ki bir anormallikten kaynaklanır. Bu grup hastalar ICSI ile çocuk sahibi olmak istediklerinde, Kistik fibroz ya da vas deferens agenezisinin çocuğa geçme riski tedavi öncesi belirlenmelidir (9).

2.1.4. Sperm Fonksiyonlarını Direkt Olarak Etkileyen Genetik Sendromlar

Spermatogenezi ve dolayısıyla sperm aktivitesini etkileyen diğer faktörleri sıralayacak olursak: Primer silier diskinezi; myotonik distrofi ve noonan sendromu, orak hücre anemisi, genetik endokrinopatiler, Gonadotropin-releasing hormonun (GnRH) üretim veya sekresyon bozuklukları, Kallman sendromu, Prader-Willi sendromu, LH ve FSH fonksiyon bozuklukları, androjen sentez ve fonksiyon bozuklukları olarak sıralayabiliriz (16–20).

İnfertilitede şiddetli erkek faktörünün Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre sınıflandırılması; Seksüel/ejakulatör disfonksiyon, immünolojik sebepler, idiyopatik gruplar, izole seminal plazma anormallikleri, iatrojenik nedenler, sistemik nedenler, konjenital anomaliler, akkiz testiküler hasar, varikosel, aksesuar bezlerin enfeksiyonu, endokrin nedenler, idiyopatik oligozoospermi, idiyopatik astenozoospermi, idiyopatik teratozoospermi, obstruktif azoospermi, idiyopatik azoospermi olarak yapılmıştır. Ayrıca idiyopatik grup, sayılan grupların içerisinde %30 gibi yüksek bir yer kaplamaktadır (15).

Erkek infertilitesinde genetik değerlendirilmenin amacı,

1. Etiyolojinin belirlenmesi
2. Fetusta oluşabilecek kromozom hatalarının öngörülmesi ve önlenmesi
3. Testiküler sperm yapımının var olma olasılığının değerlendirilmesi
4. Bir sonraki nesile aktarılacak genetik problemlerin öngörülmesi
5. Fetusta oluşabilecek metabolik hastalıkların öngörülmesi ve önlenmesi

Genetik açıdan risk taşıyan gruplar:

1. Şiddetli oligoastenoteratospermi
2. Obstrüktif azoospermi
3. Nonobstrüktif azoospermi
4. Oligoastenoteratospermi ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı,

Tablo 2.1. Genetik açıdan risk taşıyan gruplar için yapılması önerilen testler (OAT: Oligoastenoteratospermi)

Hasta Grubu	Mutlak Gerekli İncelemeler	Önerilebilir İncelemeler
Şiddetli OAT	Periferik Karyotip	Y Mikrodelesyonu CF Mutasyonu
Nonobstrüktif azoospermi	Periferik karyotip Y mikrodelesyonu	
Obstrüktif azoospermi	CF mutasyonları	Periferik karyotip
Oligoastenoteratospermi ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı	Periferik karyotip	—

2. 2. KONJENİTAL VAS DEFERENSLERİN AGENEZİSİ

Konjenital bilateral vas deferens agenezisi (CBAVD) ve konjenital unilateral vas deferens agenezisi (CUAVD), erkeklerde doğumsal olarak sperm kanallarının (vas deferens) tek ya da çift taraflı olmaması ve azoospermi (menide sperm olmaması)'ye bağlı olarak ortaya çıkan infertilite ile sonuçlanan bir hastalıktır (21, 22).

Sperm testislerin parankiminde yapılır. Sperm oluşumuyla direkt ilgisi olmasa da sertoli hücreleri bu hücrelerin beslenmesinden sorumludur. Alkali bir sıvı içinde bulunan sperm, tubulus seminiferus contortusda bulunurlar. Sıvının hafif alkali olması kuyruk hareketini kuvvetlendirir. Testis kanalcıkları (Rete Testis) aracılığıyla epididimise aktarılırlar. Tam olgunlaşma epididimisin baş bölgesinden kuyruk bölgesine kadar olan bölgede tamamlanır. Ayrıca epididimis depolanma görevi de görmektedir. Epididimisin genişleme özelliğine sahip kuyruk bölgesinde olgun sperm vas deferensin önünde toplanırlar. Epididimide ortamın hafif asidik olması sperm geçici olarak felce uğramasına sebep olmaktadır ve bu durum sperm hareketlerini

kısıtlamaktadır. Böylelikle depolanma sırasında enerji harcanması engellenmiş olur. Spermier erkek genital yollarında hareketsizdirler. Prostat bezi salgısı ile birlikte seminal vesikül (glandula vesiculosa)'ün içinde bulunan fruktoz salgısıyla karşılaştıktan sonra hareket yeteneklerini tam olarak kazanırlar. Bu bezlerin salgılarındaki herhangi bir bozukluk spermierin aktif hareketlerini kısıtlamaktadır.

Konjenital vas deferens agenezisi olan hastalar fiziksel görünüm olarak normaldirler. Sekonder cinsiyet karakterleri normal gelişir. Testisler anatomik, androjenik ve spermatojenik olarak normaldir. Seminal vesiküller çoğu zaman anatomik ve fizyolojik olarak anormaldir ve boyutları normalden küçüktürler. Meni, hacimce normalden az, asidik pH'da, fruktozdan yoksun ve azospermiktir. Spermin yapısal ve sayısal bozukluklarına göre;

Azoospermi, meninin bir takım hücreleri içermesine rağmen olgun sperm hücrelerini ve hyaluronidaz enzimini içermemesi durumudur.

Oligospermi, sperm sayısının normalden az olması (ml'de 20 milyondan az olması).

Astenoospermi, spermierin yeteri kadar hareketli olmaması (%50'den az olmaması).

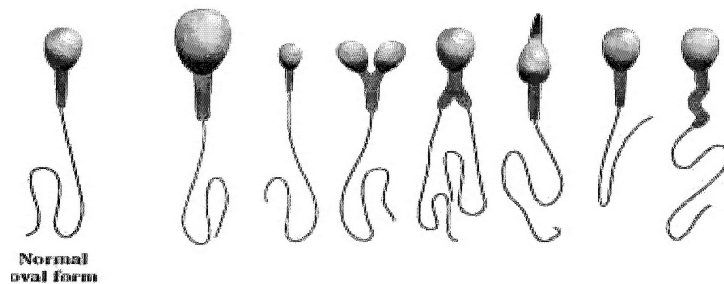
Hiperspermi, sperm miktarının çok olması (6 cc'nin üzerinde).

Hipospermi, semen miktarının az olması (1 cc'nin altında).

Aspermi, hiç meni olmaması.

Nekrospermi, tüm meninin ölü olması.

Teratospermi, spermierin morfolojik olarak bozuk olması. (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Anormal şekilli spermier

2.2.1. Semen Analizi ve Normal Sperm Parametreleri

Semen analizi belirli standart şartlarda yapılmalıdır. Semen, mastürbasyonla veya cinsel ilişki esnasında spermelere toksik etki göstermeyen prezervatiflerle toplanır. Alınan örnekler oda ısısında bekletilerek, 45 dakika içinde incelenmeye başlanmalıdır (23).

Genelde 2–3 günlük cinsel bir perhiz önerilir. Şartlara uygun olarak verilen semen örneği aşağıdaki kriterlerin aynı anda sağlanması durumunda normal spermiyogram olarak kabul edilir. Azoospermi tanısı koymak için, semenin 3000 g'de 15 dakika santrifüjünü takiben pellette hiç sperm bulunmaması ve ayrıca bu işlemin birer ay arayla üç kez tekrarlanması gerekmektedir (24). Normal sperm parametreleri Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tanımlanan kriterler (Tablo 2.2.), normal morfolojinin < % 4 olduğunda ve bunun büyük bölümünde baş anomalisi olduğu durumda ICSI başarısı düşüktür (25).

Tablo 2. 2. WHO kriterlerine göre normal spermiyogram değerleri

Kriter	Normal Değeri
Hacim	1.5 – 1 ml
Renk	Gri-Beyaz-Sarı
PH	7.2 – 7.8
Viskosite	Normal akıcılıkta
Likefaksiyon	5 – 40 dakika
Total Sperm Sayısı	50 milyonun üzeri
Sperm Konsantrasyonu	20 milyon/ml üzeri
Motilite	İleri, hızlı, en az %50 olması
Lökosit	1 – 3 milyon / ml' den az olmalı
İmmatür sperm hücre oranı	%3'den az olmalı
Morfolojik oval formlar	%50 veya üzeri olmalı
Sperm hareket kalitesi	En az 2. derece

İnfertilite de başrolde oynayan spermelerin çoğunluğu, spermatogenezdeki hatalar sonucunda olgunlaşmamaktadırlar.

2.3. Y KROMOZOMU VE AZF

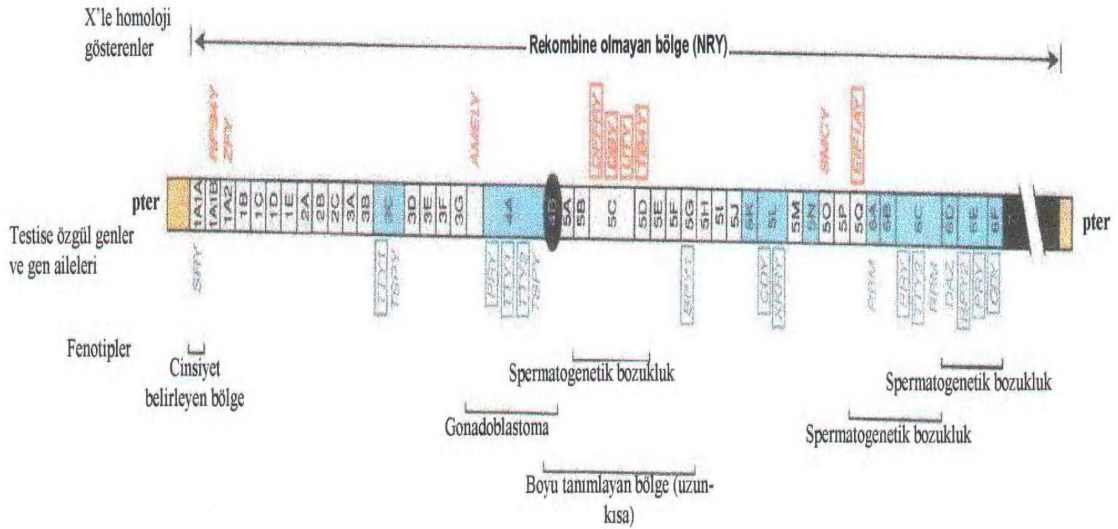
Erkek infertilitesi, bugün major bir sağlık problemidir ve üretken çağıdaki erkeklerin %40-50' sinde sperm üretiminde kalitatif veya kantitatif anomaliler bulunmaktadır (30). Genetik ve çevresel faktörlerin bu durumdan sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Bir diğer faktör ise, Y kromozomu ve spermde deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına neden olan oksidatif streştir, infertil erkeklerin semenlerinde total antioksidan kapasitede azalma ve reaktif oksijen türlerinin seviyesinde artma gözlenmektedir (30). İnsanlarda erkek infertilitesine yol açan birçok genetik neden tanımlanmıştır (31). Obstrüktif azospermisi olan hastalar kistik fibroz mutasyonu taşıyabildiği gibi, nonobstrüktif azospermisi veya ciddi oligospermisi olan hastalarda Y kromozomu uzun kolunda mikrolezyon bulunabilir (32). Spesifik gen mutasyonlarının testiküler oluşumu, iç ve dış genital bölgelerin gelişimini ve spermatogenezi ters yönde etkilediği bilinmektedir. Genitouriner traktusu etkileyen sendromlar da duktal fonksiyonu ve/veya ejakulasyonu etkileyebilir (33).

2.3.1. Y Kromozomu

İnsan Y kromozomu, spermatogenez için gerekli olan ve gonadal farklılaşmanın testis yönünde gelişmesi için gerekli olan genleri içermektedir (34). İnsan Y kromozomu 60 milyonun üzerinde nükleotid içermesine rağmen, diğer kromozomlara oranla en az gen sayısı olan kromozomdur. Y kromozomu, erkek karakteristik özelliklerinin genetik belirleyicisi olarak rol oynar ve birçok ilginç biyolojik özellikler gösterir (35). Y kromozomunun kısa kolu (Yp) ve uzun kolu (Yq) proximal bölgesi ökromatik bölge iken, Yq'nun distal bölgesi heterokromatin bölgesidir ve bu bölgenin uzunluğu değişkendir (26–29). Y kromozomunun %85'ini oluşturan erkek spesifik bölge; MSY (Y' nin erkek spesifik bölgesi), 3 ökromatik (x-transpoze, x-dejenere, amplikonik) ve bir heterokromatik mozaik zincir taşır. Bugüne kadar 156 transkripsiyon ünitesi, 78 protein kodlayan gen ve Y kromozomu ile ilgili 27 farklı protein tanımlanmıştır (37). Yp ve Yq kollarının üzerinde sırasıyla psödootozomal sınır bölgesi, PABY1 ve PABY2 psödootozomal bölgeleri ve X kromozomu üzerinde ise bunların homologları vardır. Bu bölgeler dışında kalan bölgeler mayotik rekombinasyona katılmaz. Dolayısıyla da bu durum Y kromozomunun yaklaşık %95' ini non-rekombine halde bırakır (Şekil 2.2) (34).

I) Pseudotozomal sınır bölgesi (PABY)

- II) Kısa kol üzerindeki perisentrik bölge (seks belirleyici geni -SRY- içerir)
- III) Proximal uzun kol üzerinde bulunan ökromatik bölge (DYS1)
- IV) Distal uzun kol üzerinde bulunan heterokromatik bölge (DYZ1)
- V) DYZ3, bölgelerinden oluşur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Rekombine olmayan bölgenin (NRY) gen haritası: Y kromozomu, iki terminal ucu

Y kromozomu; psödootozomal bölgelerle birlikte, heterokromatin ve ökromatin bölgeleri de içeren rekombine olmayan büyük bir bölgeyi kapsar. NRY' nin 7 interval bölgesi, gen lokalizasyonlarını belirlemek için 43 alt interval bölgeye ayrılır. Delesyon görülen intervallerin daha önceden Y' ye özgü tekrarlardan oluştuğu gösterilmiştir. X kromozomu ile homoloji gösterdiği dokuz NRY bölgesi üst tarafta kırmızı renkte, testise özgül gen ya da gen aileleri 11 adet mavi renkte gösterilmiş ve fenotiple ilgili olanlar ise en altta siyah renkte gösterilmiştir.

İnsan Y kromozomu, çoğunluğu tekrar elementlerinden oluşmak üzere, sınırlı sayıda fonksiyonel genleri içerir, ayrıca bazı alfoid tekrarlar, major insan SINE (short interspersed nuclear element) ve birkaç satellit sekans ailesini içermektedir (31). Kodlayıcı olmayan, tekrarlayıcı DNA'nın fazla olmasından dolayı Y kromozomunda delesyonlar sık görülür (24). Y kromozom mikrodelsyonları, histolojik olarak Sertoli cell only sendromu (SCOS), maturasyon arresti ve hipospermatogenezi içeren, farklı spermatogenetik değişikliklerle bağlantılıdır (29,35). Y'ye bağlı sekanslar yanında infertilite sinyal mekanizmasında yer alan protoonkogenlerdeki parakrin sistemleri veya mutasyonları kontrol eden otozomal genlerle de infertilite oluşabilir (37).

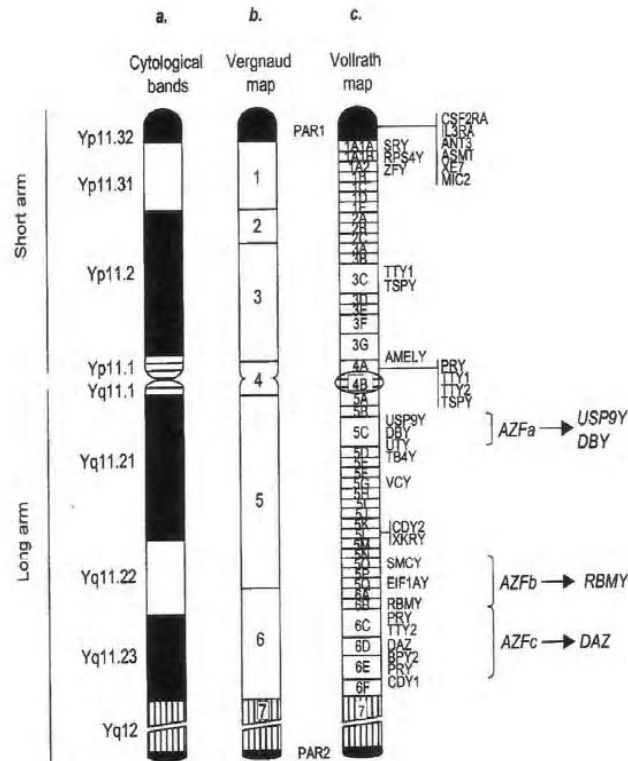
Testis gelişimini belirleyen faktörler arasında en başta SRY (Sex related Y chromosom Region - Y kromozomunun cinsiyeti belirleyen bölgesi) gelmektedir (38).

Y kromozomunun infertilitenin ortaya çıkma mekanizması iki şekilde gerçekleşir.

I. Mayoz bölünme esnasında homolog kromozomlar karşı karşıya gelmekte ve X kromozomu ile de Y kromozomu eşleşmektedir. Bunun sonucunda da bölünme gerçekleşmektedir. Bu eşleşmenin gerçekleşmemesi sonucunda da mayoz bölünmenin diğer aşamalarına geçememekte ve dolayısıyla spermatogenezis engellenmektedir.

II. Özellikle Y kromozomunun uzun kolundaki kromozomal bölgelerdeki kayıp ya da değişiklikler nedeniyle burada bulunan genler fonksiyonlarını kaybederler. Bunun sonucunda da spermatogenezis olumsuz yönde etkilenir.

Her iki şekilde de sperm sayısındaki azalma sonucunda infertilite azoospermi ya da oligospermi şeklinde görülür (27).



Şekil 2.3. Y kromozomu ve sitogenetik bandlaması, AZF bölgeleri

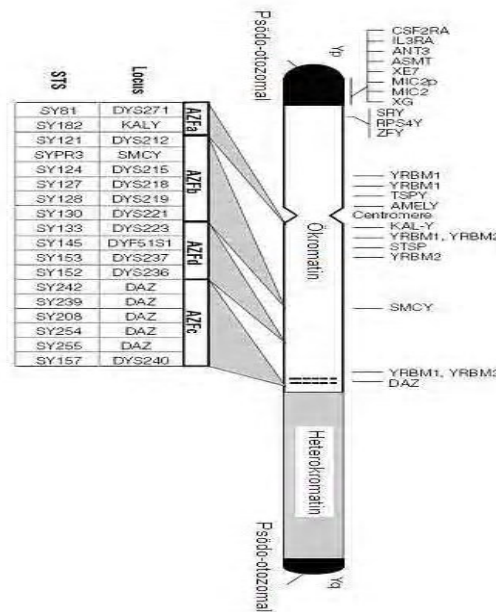
2.a. Y kromozomu sitogenetik bandlaması. Kısa kol Yp11 ve uzun kol Yq11 (ökromatin bölge), Yq12 (heterokromatin bölge);

2.b. Y kromozomunun Vergnaud haritalandırılmasına göre 7 bölgeye ayrılması (1-4 aralık kısa kol ve sentromer; 5. ve 6. aralık ökromatin bölgeye; 7. aralık heterokromatin bölgeye denk gelmektedir);

2c. Y kromozomunun 43 bölgesi haritalandırılması. Sağda Y kromozomunda lokalize bazı genlerin listesi, AZF bölgelerinin lokalizasyonu ve buna karşılık gelen genler gösterilmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda İnsan Genom Projesi verileri kullanılarak Y kromozom haritalandırılmasında birtakım değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Bu verilere göre, Y kromozomu 300'den fazla sequence-tagged sites (STSs) olarak tanımlanan bölgeye ayrılmıştır. STSs bölgeleri Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılabilen genomik DNA bölgeleri olarak bilinir. Bu bölgeler bir gene spesifik olabilecekleri gibi, Y kromozomu üzerindeki anonim bölgelerle de çakışabilirler. İlk defa Tiepola ve Zuffardi tarafından, erkek infertilitesi (azoospermi) ile Y kromozomu uzun kolu (Yq11 bölgesi) delesyonlar arasında ilişkisi sitogenetik olarak fark edilmiş ve bu bölgede lokalize genlerin erkek germ hücresi gelişimi için önemli olduğu hipotezi ortaya atılmıştır (2). Bu gen ve gen ailesi 'azoospermia factor (AZF)' olarak adlandırılmıştır. Bununla birlikte AZF bölgesinin genetik kompleks yapısı ancak YAC (yeast artificial chromosome) ve STS dayalı haritalandırmanın geliştirilmesiyle ortaya koyulmuştur. Bu analizler sitogenetik seviyede görülemeyen, submikroskopik delesyonların saptanmasına imkân tanır. Kromozom analizleri ile belirlenemeyen, sadece STS-PCR veya Southern-hibridizasyon ile saptanabilen bu delesyonlar mikrodelesyonlar olarak adlandırılır.

Spermatogenesis ile ilgili Y kromozomu q kolunda bu bölgeler proksimalden distale AZF a, AZF b ve AZF c olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.4)



Şekil 2.4. AZF bölgeleri

2.3.2. AZF (Azoospermi Faktör)

Moleküler biyoloji alanındaki hızlı ilerlemeler; Y kromozomu mikrolelesyonlarının, testisteki ciddi patolojik problemlerinin ve erkek infertilitesinin en sık nedenlerinden biri olduğunu göstermektedir. İlk olarak spermatogenezisteki bozukluklar ile genetik yapı arasındaki ilişkilerin temeli Tiepolo ve Zufferdi tarafından infertil erkekler arasında sitogenetik çalışmalar yapılarak mikroskobik çalışmalarla atılmıştır. Daha sonra moleküler düzeyde geliştirilen tekniklerin kullanılmasıyla 1988’ de Anderson ve arkadaşları Y kromozomunun uzun kolunda AZF bölgesini tanımlamıştır. Bu bölgelerin Yq11.22–23 (Şekil 2.4) lokalize olduğu ve AZF a, AZF b ve AZF c olmak üzere üç bölgeden oluştuğu gösterilmiştir. 1992’ de ise PCR tekniğini kullanarak Y kromozomunun haritalandırılmasındaki ilk çalışma Foresta ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Erkek infertilitesine yol açan Y kromozomu mikrolelesyonları, AZF bölgelerindeki delesyonlar sonucunda ortaya çıktığı gösterilmiştir.

Y kromozomu 7 delesyon aralığına ayrılmıştır (94,100). Bu aralıkların her biri de alt aralıklara (subinterval) ayrılmıştır. Spermatogenezde önemli olan genler, Y kromozomunun uzun kolunda, 5. ve 6. delesyon aralığında, 11.23 bandında lokalizedir. Bu bölge azoospermik faktör bölgeleri (AZF) olarak bilinmektedir. AZF a proximal Yq11’ de yer alırken, AZF b ve AZF c distal Yq11’de yer almaktadır. Bu bölgeler birbiriyle çakışmamaktadır. Bu AZF genleri, RNA bağlayıcı proteinleri kodlarlar ve gen ekspresyonu, RNA metabolizması, paketlenmesi, sitoplazmaya transportu ve splicing regülasyonunda yer alırlar. 1992’ de Vollrath ve arkadaşları Y kromozomunun 43 aralıklı bir delesyon haritasını düzenlemişlerdir. Bu bölgeler Y kromozomu boyunca uzanan STS denen bölgeleri içermektedir (3,21,32,36). Y kromozom mikrolelesyonları, Klinefelter sendromundan sonra spermatogenik bozukluğun ve erkek infertilitesinin ikinci en sık sebebidir (33,37).

Birçok araştırmada, Y mikrolelesyonları ile spermatogenez arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (95,96). AZF a bölgesindeki delesyonların Sertoli Cell Only Sendromuna (SCOS), AZF b bölgesindeki delesyonlar matürasyon arrestine ve AZF c bölgesindeki delesyonların hipospermatogenez sebebinde olduğu ortaya çıkmıştır. En son yapılan çalışmalarda AZF d bölgesi tanımlandıktan sonra bu bölgenin delesyonu sonucunda da hafif oligospermi ve sperm morfolojisinde değişiklikler olduğu gösterilmiştir (40,109).

2.3.2.1. AZF a Bölgesi

Y kromozomunun uzun kolunun en proksimal bölgesidir. Buradaki genler hücresel housekeeping genleri olarak tanımlanır (40). AZF a bölgesi yaklaşık 1100 kb'lik bir alanı kapsamaktadır. Tek kopya genleri olan dört aday gen içermektedir.

I. DFFRY (Drosophila Fat Facets Related Y, USP9Y); ubiquitine spesifik hidrolaz enzimini kodlar. Bu genin ekspresyonu testise özgü değildir. USP9Y olarak da bilinir. AZF a bölgesinde yer alan ilk tanımlanan genidir. Tek kopyalıdır ve 46 ekzonludur. "Drosophila developmental gene fat facets" ile homoloji gösterdiği için ilk zamanlar da DFFRY olarak adlandırılmıştır. X kromozomu üzerinde homoloğu vardır ve bu X inaktivasyonundan kaçır. Ekspresyonu yaygındır. Ubikitine bağlı protein yıkımından sorumludur. Proteinlerin ubikitin ile birleşmesini engelleyerek yıkımını önlediği belirtilmektedir. Özellikle sinyal iletim kaskadında rol alan üyeleri hedefler. Oosit gelişiminde ve fotoreseptörlerde de rolü vardır. Delesyonunda spermatojenik arrest görülür. USP9Y ile birlikte DBY genlerinin her ikisini kapsayan delesyonlarda bu tablo ağırlaşmakta ve azoospermiye neden olmaktadır (91).

II. DBY (Dead Box Polypeptide Y); RNA helikaza özel bir motifi içeren proteini kodlar (4). Tanımlanan iki transkripti vardır. Bunlardan kısa olan özellikle testiste eksprese olurken uzun olanı diğer dokularda da görülür. Subinterval 5C'de yer alan 17 ekzonlu, tek kopyalı "housekeeping" bir genidir. X kromozomunda homoloğu vardır ve X inaktivasyonundan etkilenmez. Tüm dokularda tek bir transkript okunurken, testiste ifade olan kısa farklı bir DBY transkripti daha vardır. Farelerdeki testise özel ve sadece germ hücrelerinde sentezlenen PL10 proteini ile homoloji göstermektedir. Bu nedenle Foresta ve arkadaşları DBY'nin spermatojenik aşamalarda anahtar role sahip olduğunu ileri sürmektedir. Bu genin ürünü ATP-bağımlı RNA helikazdır ve bu bir dead-box motif içeren bir proteindir. DBY delesyonlarında sertoli-hücre sendromu veya ağır hipospermatogenez izlenmektedir (35, 91).

III. UTY (Ubiquitous TPR motif on Y); Subinterval 5C'de yer alan 20 ekzonlu bir genidir. TPR (tetratricopeptide repeat) motifli bir protein kodlamaktadır. Bu proteinin, protein-protein etkileşimini düzenlediği düşünülmektedir (91).

IV. TB4Y (Thymosin, beta-4, Y chromosome): Subinterval 5D'de yer almaktadır. X kromozomu üzerinde yer alan X inaktivasyonundan etkilenmeyen bir homoloğu (TB1X) mevcuttur. Testise özel transkriptleri bulunmaktadır. Aktinin salgılanmasında rol alan thymosin B4'ün Y izoformunu kodlar. DBY, UTY ve TB4Y genlerinin hepsi "hücrel housekeeping"e katılırlar.

AZF a bölgesinin komplet (tam) delesyonunda AZF a'da yer alan iki genin içinde bulunduğu 792 kb'lik kısmı uzaklaşır. Sadece USP9Y veya DBY'yi içeren delesyonlar daha az görülmektedir. Bu iki genin mutasyonu spermatogenik bozukluğa yol açmaktadır. Çoğu AZF a delesyonu birbirinden 800kb uzaklıkta olan 10 kb'lık iki tekrar dizisi arasındaki rekombinasyondan kaynaklanır. Yapılan diğer bir çalışmada AZF a bölgesindeki genlerden birinin delesyonu sonucunda da kısa boyluluk görüldüğü belirtilmiştir (3,40,41,91).

2.3.2.2. AZF b Bölgesi

AZF b delesyonları infertil erkek populasyonunda %13 oranında görülmektedir, fakat hasta seçim kriterlerine göre insidansı %1-5 oranında artmaktadır. RBMY1 (Related Binding Motif of Y) geni AZF b delesyonlarında aday bir genidir ve tanımlanan ilk AZF aday genidir. Ekspresyonu testise sınırlıdır. Bu gen Y kromozomunun her iki kolunda yer alan, gen ve psödogenlerin yaklaşık 30 kopyasını içermektedir, fakat fonksiyonel olan genlerin AZF b bölgesinde Yq'da toplandığı düşünülmektedir. Fakat bu bölgede RBMY1 genini etkilemeyen delesyonlar da görülmektedir. Bunun nedeni de tekrar dizileri arasındaki homolog rekombinasyondur. AZF b bölgesi AZF c bölgesi gibi palindromlarda organize olan büyük tekrar dizileri içeren bir yapıya sahiptir, fakat bunların çoğunluğu tek kopya dizileridir. Yine bu bölgede testiküler fenotipten sorumlu diğer bilinen veya bilinmeyen genler olabilir, yani başka AZF b aday genleri bulunabilir (35,43). RBMY1, RNA bağlayıcı motife sahip heterojen nükleer ribonükleoprotein G (hnRNP-G) ailesine aittir. Bu aile proteinleri nükleer poliadenilatlanmış RNA ile birleşir ve RNA paketlenmesi öncesinde, mRNA'nın sitoplazmaya transferi ile RNA olgunlaşmasında fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. Bunun sebebi nükleusta olgunlaşma faktörleri ile birlikte olması ve erken spermatogenezde RNA proseslerinde ya da translasyonel kontrolde rol oynamasıdır (4,43). RBMY1' in hem insanda (Xp26) hem de farede X kromozomunda homoloğu vardır. Otozomal homoloğu farede 14., insanda da 6. kromozomda yer almaktadır. AZF b'deki diğer genler; SMYC (selected

Mouse cDNA homolog, Y chromosome), EIF1AY (translation initiation factor 1A, Y isoform), TTY2 (testis transcript Y2) ve PRY (protein tyrosine phosphatase related Y)'dir. PRY, Y kromozomunun hem uzun hem de kısa kolunun üzerinde bulunan multigen ailesinin üyesidir. Bir kopyasının AZF b, diğer kopyasının da AZF c bölgesinde olduğu bilinmektedir (44). AZF b delesyonları, RBMY1 geninin delesyonu demektir. Bu delesyon da, mayozun tamamlanamamasına sebep olmaktadır; yani bu protein eşey germ hücrelerinin mayozun başında değil sonunda yani haploid evreye geçiş evresinde önemlidir (4,45).

2.3.2.3. AZF c Bölgesi

AZF'ler içinde, AZF c ciddi oligospermik ve azospermik hastalar içinde, özellikle nonobstrüktif infertilitesi olan erkeklerde en sık delesyona uğrayan bölgedir. İnsan genomik yapısının giderek anlaşılmasıyla, Y kromozomu uzun kolunun palindromları ve tekrarları içeren çok sayıda DNA sekansına sahip olduğu ortaya konmuştur (35, 46–49). Bu karakteristik yapıdan dolayı azospermik veya oligospermik erkeklerde bulunan AZF bölgelerinde delesyonların meydana geldiği düşünülmektedir (50). AZF c, ana aday geni DAZ (Deleted in Azoospermia) kümesidir. DAZ gen grubu, PRY, BPY2, TTY2, CDY ve RBM'nin kopyalarını içerir. Erişkin testisinde transkripsiyon ve germ hücrelerinde eksprese olan bir gen kümesidir (22, 44). Bu bölgede tümü testise özel 19 transkripsiyon ünitesine sahip 7 ayrı gen ailesi bulunmaktadır (40). AZF c bölgesinde büyük delesyonlar olduğu gibi, yine bu bölgede kısmi (parsiyal) delesyonlar da görülebilir. Bu kısmi delesyonlar az sayıda genlerin ve transkripsiyon birimlerinin kaybına neden olabilir (50). AZF c bölgesi, AZF c aday geni olan DAZ haricinde çok sayıda testis spesifik gen ailesi içermektedir. Bu bölgede oldukça uzun tekrar dizileri bulunmaktadır ve çoğu AZF c delesyonunun 3.5 Mb'lık bir segment kaybına yol açan iki 229 kb'lık tekrar dizileri arasındaki homolog rekombinasyon sonucu oluştuğu tespit edilmiştir (45). AZF b ve AZF c bölgelerinin her ikisi birden 24 geni kapsamaktadır. AZF b' nin komplet delesyonu 6.2 Mb'lık bir kısmı uzaklaştırırken, AZF c' nin komplet delesyonu ise 3.5 Mb'lık bir kısmı uzaklaştırır ve en sık görülen Y kromozom delesyon bölgesidir (51). RBM ve DAZ genleri, RNA binding proteinleri kodlarlar. Bu proteinler, RNA metabolizmasında yer alan, RNA paketlenmesi, sitoplazmaya transportu ve splicing gibi işlemlerde yer alan heteronükleer ribonükleer protein (hnRNP) ailesine benzer yapıda olan proteinlerdir. Bu bölgelerin fiziksel boyutu, AZF a ve AZF b için 1–

3 Mb, AZF c için ise 3 Mb olarak tahmin edilmektedir (43). Önceleri tek kopyası olduğu düşünülen DAZ geninin 1996'da çoklu kopyası olduğu ve fonksiyonel homologunun insanda 3. kromozomda olduğu bildirilmiştir. Dizi analizleri, primatların evrimi esnasında otozomal DAZ geninin Y kromozomuna geçtiğini, Y kromozomuna uyum sağlayan gen içinde ekzonların çoğaltılması sonucunda DAZ kümelerinin oluştuğunu göstermiştir. Hem buldukları yer hem de üstlendikleri fonksiyonlar, DAZ proteinlerinin geç spermatit evresinde mRNA'ya bağlandığı ve spermatogenezin geç translasyonel evresinin kontrolünde görev aldığını göstermektedir (53).

2.3.2.4. AZF d Bölgesi

Kent ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada Y kromozomu üzerinde ilk defa AZF b ve AZF c arasında dördüncü bir bölge olan AZF d tanımlanmıştır (3). Bu bölgede mikrolelesyona sahip hastalarda hafif oligospermi veya normal sperm sayısı gözlenmesine rağmen, anormal sperm morfolojisi saptanmıştır (28). AZF b, AZF c ve AZF d bölgelerindeki delesyonlar sertoli Cell Only Sendromu (SCOS), komplet spermatogenik arrest/azoospermi, oligospermi gibi çeşitli testis histopatolojileri ile birlikte de olabilir (51).

2.4. Y KROMOZOM MİKRODELESYONLARININ OLUŞ MEKANİZMASI

Y kromozomunun uzun kolundaki tekrar dizilerindeki kopya sayılarının artması, Y kromozomunun sabit olmadığını göstermektedir. Delesyonlar, anormal rekombinasyon olayları sırasında ortaya çıkabilmektedir. Homolog bölgeler arasında benzer dizi tekrarlarında, X ve Y kromozomları arasında, Y kromozomunda eşit olmayan kardeş kromatid değişimi sırasında veya DNA replikasyonu esnasında çerçeve kayması sonucunda oluşan kırılmalar nedeniyle delesyonlar meydana gelir. Baba yaşı ilerledikçe Y kromozomu üzerindeki dizi kayıplarının arttığı belirtilmiştir (40). Y mikrolelesyonları mayoz sırasında ya da spermatogenezde hatalı DNA paketlenmesi ile meydana gelebilmektedir. DNA paketlenmesi düzenli loop serileri halinde nukleusda olmaktadır. İnsanda loop bölgeleri histonların protoaminlerin yer değiştirmesi esnasında meydana gelmektedir. Bu şekilde replikonlar transkripsiyona kolay ulaşılabilir konuma gelmektedir. Loplara, yaklaşık 1,4–3,6 Mb arasında bir uzunluğa sahiptir ve bu da Y kromozomunda oluşan mikrolelesyon boyutu ile aynıdır. Bu da Y mikrolelesyonu taşıyan oligospermik erkeklerin ileriki yıllarda azospermi olma olasılığının yüksek olduğunu göstermiştir (54).

2.5. DOĞUŞTAN VAS DEFERENS'İN TEK YA DA ÇİFT TARAFLI YOKLUĞU VE KİSTİK FİBROZİS GENİ

Vas deferens yokluğu infertilite kliniklerinde daha az sıklıkta tespit edilebilen klinik patolojidir. Hastaların yaklaşık %1' inde tespit edilmektedir. Vas deferens yokluğu tek ya da çift taraflı olarak görölmektedir (14). Erkeklerde doğumsal olarak sperm kanalının (vas deferens) yokluğu ile azoospermiye bağlı infertiliteyle tanımlanan bir hastalıktır. Bu bireylerde sperm üretimi ve yumurtayı dölleyebilme yeteneği bakımından sperm kalitesi tamamen normal olmakla birlikte, testislerden üretilen ve epididimde olgunlaşarak depolanan spermier iletim kanalından sorumlu sperm kanallarının olmamasından dolayı ductus ejakulatoriusa iletilemez. Bunun sonucunda da azoospermi ve infertilite oluşur (67). Vas deferenslerin çift taraflı yokluğu izole bir anomali olarak görölebileceği gibi sistemik kistik fibrozis hastalığının bir parçası olarak da ortaya çıkabilir. Alternatif kesim bölgelerinde meydana gelen değişiklikler sonucu oluşan hastalık patogenezi açıklayan en iyi örnek, doğuştan bilateral vas deferens eksikliği (CBAVD)'dir. CBAVD erkek infertilitesinin %1-2'sinden sorumlu olan otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalıktır (14). Kistik fibrozisin genital formu olarak adlandırılan CBAVD'de kistik fibrozise neden olan "Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)" gen mutasyonları görölmektedir. Bu iki durumun ayrı birer antite olarak tedavi edilmeleri klinik bakımdan uygun görölse de, moleküler çalışmalar izole CBAVD olgularının büyük kısmının CFTR genine ait mutasyonlara bağlı olarak gelişmiş kistik fibrozisin bir minör varyantı olduğunu ortaya koymuştur (97-99). Birlikte renal anomalilerin (tek taraflı agenezi, ektopi, at nalı böbrek gibi) eşlik ettiği CBAVD olgularında genellikle mutasyon bulunmamaktadır. Bu durum keza seminal veziküllerin ve ampulla vas deferens anatomilerinin ultrason ile normal bulunduğu CBAVD'li erkekler için de geçerlidir. Dolayısıyla, vas deferenslerin konjenital bilateral yokluğu etyolojik olarak heterojenite gösteren bir durumdur. Tanıda genital sistemin anatomik anomalileri ve semen parametreleri hem CBAVD' de hem de kistik fibrozis hastalarında aynıdır. CFTR mutasyonu taşıyan azoospermik erkeklerde ejakulat volümü, ejakulat früktoz konsantrasyonu ve pH'sı mutasyon taşımayan azoospermik erkeklerden veya fertil erkeklerden belirgin ölçüde düşük bulunur. CBAVD' li erkeklerde üriner sistem anomali riski artmış olup, CFTR mutasyonu ile birlikte olmayan formuna işaret eder. CBAVD olgularının hepsinde renal ultrasonografi rutin olarak yapılmalıdır (15).

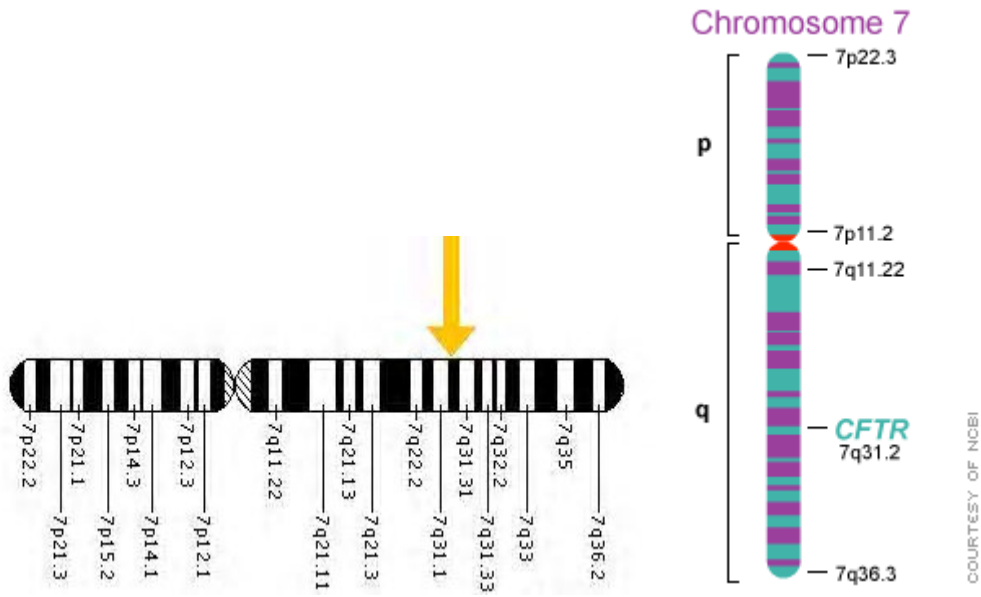
Çoğu tek taraflı vas deferens agenezi olgusu fertil olup, klinik bir sorun oluşturmaz. Ancak, vazektomi sırasında tesadüfen bulunabilir. Nadir de olsa azoospermi ya da şiddetli oligozoospermi olgularında da görülebilir. Aslında bu olguların başlangıçta "tek taraflı intraskrotal vas deferens aplazisi" olarak tanımlanması uygun olur. Çünkü vas deferens distal kısmı klinik muayenede anlaşılabilir. Tek taraflı vas deferens agenezi olgularının büyük kısmında karşı taraf seminal kanalın distalinde obstrüksiyon söz konusudur ve bazı çalışmalarla, bu hastaların CFTR mutasyonları taşıdığı tespit edilmiştir. Literatürde aynı durumda karşı vas deferensin sağlam olduğu erkeklerde CFTR mutasyonunun son derece nadir saptanığı belirtilmektedir. CBAVD' de olduğu gibi bunlarda da başta tek taraflı böbrek agenezi olmak üzere üriner sistem anomalileri tabloya eşlik edebilir (55).

2.5.1. Kistik Fibrozis Geni

Kistik Fibröz (CFTR) Geni; 1989 yılında Rommens, Riordian, Kerem ve arkadaşları tarafından tanımlanmış, izole edilmiş ve klonlanmıştır. Kistik fibrozis otozomal resesif bir hastalıktır (CF). Rinosinüzit, nazal polip, obstruktif akciğer hastalığı, rekurren pulmoner infeksiyonlar, gastrointestinal sistem malabsorpsiyonu, yağ intoleransı, yağlı dışkı, kolelityazis, karaciğer disfonksiyonu, intestinal obstrüksiyon klinik tabloda görülen semptomlardır. Sıklıkla 30–35 yaşlar civarında akciğer patolojileri nedeni ile hayatlarını kaybederler. Kistik fibrozis hastalarının sadece %2-3'ü fertildir, bu hastaların %65-95'inde vas deferens agenezisi bulunmaktadır (57). Kistik fibrozis Avrupa'da insidansı 1/2500 ve taşıyıcılık frekansı 1/25 gibi oldukça yüksek rakamlara sahip olmakla birlikte Asya popülasyonunda ve siyah ırkta oldukça nadir görülmektedir. Ülkemizde yapılan CF taramalarında bu oran yaklaşık 1/3000 civarlarında olduğu rapor edilmiştir (58, 59, 69,113). Konjenital bilateral vas deferens agenezisinin (CBAVD) genetik temeli kistik fibrozis ile aynı temele dayanması nedeniyle önem taşımaktadır. 7. kromozom üzerindeki kistik fibrozis geninin klonlanmasını takiben bir dizi mutasyonun kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) gen üzerinde farklı etkilere neden olduğu tespit edilmiştir. CFTR geni 7. kromozomun uzun kolunun q31–32 bandında yer alır ve 250 kb' lık CFTR proteinini kodlar (Şekil 2.5) ve bu gen 27 ekson içerir ve 6,5 kb' lık mRNA sentezler. Yapılan moleküler ve bağlantı analizleri tüm genin 7. kromozomdaki CFTR lokusuna ait olduğunu ve başka bir gende olmadığını göstermiştir. Klinik heterojenite allellik heterojeniteye bağlıdır. $\Delta F508$ mutasyonu en

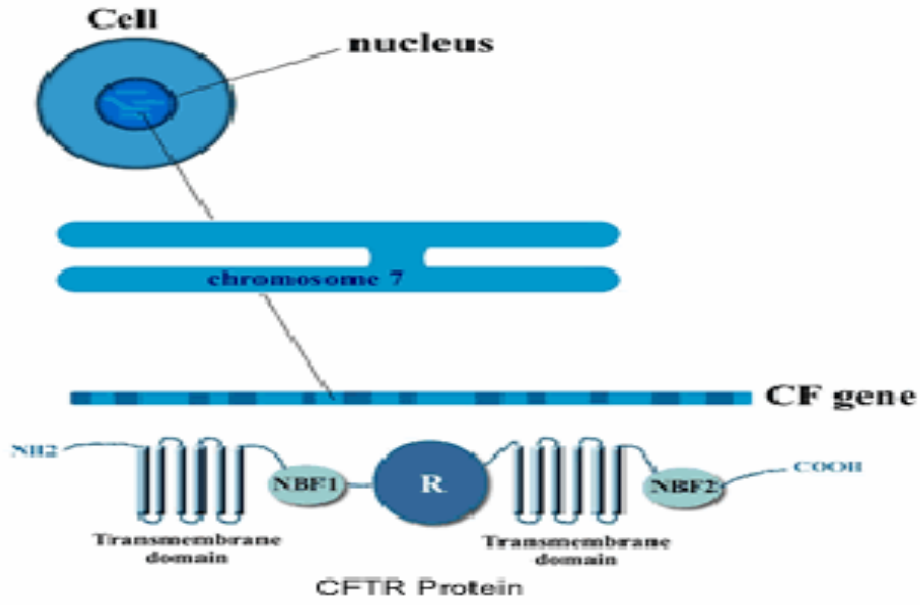
sık ve en ağır rastlanan mutasyondur (60,69). Ancak bu mutasyonun frekansı populasyon ve jeografik altyapıya göre değişiklik göstermektedir. Türk halkına uyan bu tipte bir mutasyon net olarak tespit edilememiştir.

Mutasyonların farklı şekillerdeki kombinasyonları farklı fenotiplere neden olmaktadır (61). CFTR gen mutasyonları "şiddetli" ve "hafif" formlar olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Şiddetli formu homozigotluk durumunda komple kistik fibrozis tablosu ile ortaya çıkarken, hafif formu kronik bronşit gibi daha az belirgin fenotipik bulgularla belirir. Bu mutasyonların dışında, CFTR geninin intron 8 bölümünde ortaya çıkan polimorfizm de CBAVD' in moleküler patolojisinde önemli rol oynamaktadır. Buradaki polimorfik sekanslar 5, 7 veya 9 timidin rezidülerini ilgilendirmekte olup, 5T, 7T veya 9T allelleri olarak da adlandırılmaktadırlar. 7T ve 9T allelleri fonksiyonel olarak nötral olmalarına karşın, 5T alleli CFTR mRNA'sının ayrılmasını bozarak etkin olur. mRNA'nın büyük kısmında ekson 9 eksik kalır ve aktif CFTR proteini sentezlenemez. 5T alleli hafif mutasyon formuna benzer bir fonksiyonel bozukluk ortaya çıkarır.



Şekil 2.5. 7. Kromozom ve CFTR geni

Kistik fibrosis hastalığında belirtiler tüm salgı bezlerinde görülür. Normalde mukus üreten dış salgı bezleri ince ve akışkan mukus salgısı üretirler. Fakat kistik fibrosisli hastalarda üretilen mukus salgısı çok yoğun ve yapışkandır. Bu hastalık kronik akciğer hastalığı, pankreatik dış salgı yetersizliği ve anormal yüksek ter elektrolit değerleri üçlüsü ile karakterize edilir (62). Gen ürünü klor kanalı olarak işlev yapan glikozillenmiş transmembran proteindir ve ekzokrin dokuların (akciğer, pankreas, ter bezleri, vas deferens) epitel hücrelerinde ifadelenen bir proteindir (63). CF olgularında 1500'den fazla mutasyon ve 200 polimorfizm belirlenmiştir (64,78). Genin 5' ucundaki promotör bölgesi GC (Guanin-Sitozin) nükleotidleri açısından yüksek bir zenginlik gösterir. TATA kutusu veya CAAT kutusu yoktur. Başlama kodonu 1. eksonun +72 pozisyonunda bulunmuştur. En küçük ekson, 38 bp uzunluğundaki 14b eksonudur. En büyük ekson ise 724 bp uzunluğundaki 13 eksonudur. İntronların uzunluğu da farklıdır (65). Kistik fibroz geninin ürünü olan protein 1480 aminoasit içerir ve bu genin 6.5 kb'lık mRNA'sı tarafından kodlanır. Bu protein, kistik fibrozis hücre zarından geçişi düzenleyen protein, CFTR proteini olarak adlandırılmaktadır. Bu protein cAMP ve protein kinaz A'ya bağımlı olarak çalışan bir Cl⁻ kanalı görevi yapmakta olan plazma zarı proteindir. Bu proteinin aminoasitleri iki benzer motifte organize olmuştur. Her bir motif 6 adet hidrofobik transmembran segment ve bir adet nükleotid bağlanma bölgesi; NBF (nucleotide binding fold; NBB) içermektedir (Şekil 2.6). İki motif birbirinden düzenleyici bölge (regulatory domain, R domain) ile ayrılmaktadır. Bu bölge serin aminoasitlerinden zengin, hidrofilik bir bölgedir ve protein kinaz A tarafından fosforlanır (66). İlk NBF 9, 10, 11 ve 12 eksonlarının nükleotid dizisi ile kodlanır (65).



Şekil 2.6. CFTR proteini

CF genindeki değişik mutasyonlar hastalığın farklı tablolarla ortaya çıkmasına sebep olurlar. Mutasyonun gende bulunduğu konuma, mutasyonun türüne, bölgenin proteinin hangi kısmını kodladığına ve mutasyonun protein sentezi üzerindeki etkisine bağlı olarak; oluşan mutasyonların bazıları ağır hastalık tablosuna neden olurken, bazıları daha hafif tablolar oluşturmakta, bazıları ise hastalığın herhangi bir belirtisini göstermemektedir (69).

Birçok populasyonda en sık görülen ve en önemli, majör olarak adlandırılan mutasyon CF geninin 10. ekzonunda 1652 ve 1655 nükleotidleri arasında üç baz çiftlik (CTT) ve olgun CFTR proteininde 508. pozisyonunda yer alan fenilalanin eksikliği ile sonuçlanan $\Delta F508$ mutasyonu CF mutasyonlarının %70'ni oluşturmaktadır (65). Fakat populasyonlar arasında %30–88 arasında değişmektedir.

Mutasyonlar etkilerine bağlı olarak CFTR gen ekspresyonunda veya sentezden sonra CFTR proteininin işlevinde bir takım bozukluklara neden olur. Mutasyon sonucunda CFTR proteini hatalı sentezlenir ve klor iyonlarının epitel hücrelerinden yanlış taşınmasına sebep olur. Bunun sonucunda da terle iyon kaybının artışı, dehidrate viskoz vücut salgıları, başta erkek üreme sistemi ve akciğerler olmak üzere solunum yollarında yoğun mukus birikimi, tekrarlayan enfeksiyonlar sonucu tıkanmalar ve doku harabiyeti, diğer salgı bezlerinde ve kanallarında tıkanıklık ve bunların sonucunda ortaya çıkan

fonksiyon bozuklukları ya da harabiyetidir. Örneğin I148T mutasyonunun etkisi, 1992'de yapılan iki ayrı çalışmada etkisi ortaya çıkarılmıştır. Bu mutasyon ekzon 4' te bulunmaktadır (88,89). Suaud ve arkadaşları, I148T mutasyonu görülen *Xenopus* oositlerinde CFTR gen mutasyonlarının Na⁺ kanalları ile direkt bağlantılı olduğu, mutasyon sonucunda kanalda ki Na⁺ iyonlarının geçişinin olmadığı için hücre içinde ki bikarbonatın artış göstererek salgının daha viskoz olduğunu ve bu durumun tıkanmaya sebep olduğu gösterilmiştir (90).

CFTR geni, iç kısmı epitel ile kaplı bütün doku ve organlarda başta akciğerler olmak üzere solunum yolları epiteli, pankreas, ter ve tükürük bezleri, kanal hücreleri, karaciğer, ince ve kalın bağırsaklar, safra yolları, erkek üreme sistemi, böbrek tubülüsleri, uterus ve overler, erken dönemde fetüs kalp kası, fibroblastlar ve beyinde belirgin oranlarda eksprese olduğu gösterilmiştir (69).

2.5.2. CFTR Gen Mutasyonlarının Oluşum Mekanizmaları

CFTR gen mutasyonları sonucunda, salgı hücrelerinin apikal membranında bulunan klor kanallarının bozukluğu ortaya çıkmaktadır. Cl⁻ iyonlarının geri emiliminin gerçekleşmemesi sonucunda, dış ortama daha fazla Cl⁻ iyon atımı gerçekleşir. Buna bağlı olarak da Na⁺ ve K⁺ atılımı artar. Bu durum, deri yüzeyinde tuz kristallerinin oluşumu görülürken, özellikle üreme organlarında normalden fazla elektrolit kaybı, bilhassa Na⁺ kaybı ekzokrin salgılarının ve diğer vücut sıvılarının miktarca az, oldukça viskoz ve tıkaçıcı özellik kazanmalarına sebep olurlar. Bu da atipik CF olarak karşımıza çıkar (71). Epitel yüzeyindeki bu bozukluklar CF geninde oluşan değişik mutasyonlar ve polimorfizmler sonucunda ortaya çıkar.

Bu mutasyonlar; missense (yanlış anlamlı) mutasyon (I148T), nonsense (anlamsız) mutasyon (G542X), delesyon (nükleotid kaybı) mutasyonu (Δ F508), frameshift (çerçeve kayması) mutasyonu (3196del54), splice site (kırılma bölgesi) mutasyonu (621+1G→T) olarak karşımıza çıkarlar.

Bunların dışında polimorfizmler vardır. Protein yapı ve işlevinde herhangi bir değişikliğe neden olmayan koruyucu nitelikteki DNA dizi değişiklikleridir. Aminoasit değişimi benzer özellikteki başka bir aminoaside dönüşür (72).

CFTR geni 9. ekzonunun delesyonu sonucunda işlevsiz protein üretimine neden olan en önemli etken, intron 8 ile ekzon 9 arasındaki splicing (kırılma) bölgesine yakın değişik sayıdaki GT tekrarlarına ve 5T varyantı olan polimidin zincirinin varlığıdır. (TG)_n(T)_m olarak tanımlanan bu mutasyon, öncül mRNA'sının ekzon 9'u bırakacak şekilde kırılması ve 9. ekzonunu içermeyen mRNA transkriptlerinin oluşmasına neden olmaktadır. TG tekrarlarının 9–12 olduğu ve poli T tekrarlarının 5T, 7T ve 9T şeklinde olduğu gösterilmiştir. T varyantları CFTR gen mutasyonları ile birlikte görülebilir. Örneğin; I148T mutasyonu taşıyan bireylerin diğer allelinde 5T ya da 7T ya da 9T varyantları taşıdığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Özellikle CAVD ile ortaya çıktığı görülmüştür.

2.6. POLİMORFİZM

2.6.1. Genetik Polimorfizm

Bireylerin kromozomlarında aynı yerde bulunan DNA dizileri birbirine benzerlik gösterir. Popülasyonda iki farklı birey arasında DNA'nın yaklaşık 1000 baz çifti uzunluğundaki herhangi bir kısmı ortalama sadece bir baz çifti değişimi içerir. Bir genin belli bir lokusta yer alan alternatif kopyalarından her birine “allel” adı verilir. Alleler, yaygın olduğu zaman genel popülasyonda kromozomlarda %1'den daha fazla bulunur; bunlar da “genetik polimorfizm” olarak bilinirler. Aksine, alleller %1'den daha az sıklıkta ise, nadir değişimler (rare variants) olarak isimlendirilirler. İntronlarda ve genler arasında lokalize olmuş DNA dizilerinde değişim gösteren bazı alleller vardır. Bunlar, herhangi bir genin fonksiyonu için önemsizdir ve sadece direkt DNA analizleri ile belirlenir. Genlerin kodlanan dizi değişimleri farklı protein çeşitliliğine, bu durum da farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına sebep olur. Genetik hastalığa neden olan zararlı mutasyonların birçoğu nadir değişimlerdir. Ağır genetik hastalığa neden olan mutant alleller genetik çeşitliliğin sonucudur. Birçok proteinin, farklı popülasyonlarda nispeten yaygın ve ayrılabilen şekillerde olduğu tespit edilmiştir.

Bu tip polimorfizmler, DNA dizilerindeki farklılıkların bir sonucu olmasına rağmen DNA dizilerinin incelenmesinden ziyade, alleller tarafından kodlanan proteinlerdeki çeşitlilik de, bazı polimorfik lokuslar çalışılabilir (77).

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

Herhangi bir bireyin, tüm lokusların yaklaşık %20'sinde allellerin yapısal olarak farklı polipeptidler için heterozigot olduğu gösterilmiştir. Farklı etnik gruplardan bireyler mukayese edildiğinde proteinlerin büyük kısmının tespit edilebilen polimorfizmi gösterdiği saptanmıştır. Böylece kendi enzimlerinin yapılışını ve diğer gen ürünlerini içeren insan türleri içinde önemli derecede biyokimyasal bireysellik vardır. Birçok biyokimyasal yoldaki ürün etkileşim halindedir (77).

2.6.2. Tıbbi Genetikte Polimorfizmlerin Kullanımı

Polimorfizmler, tüm insan genetik araştırmalarında anahtar niteliğindeki elementlerdir. Polimorfizmler genin farklı kalıtsal formlarını veya genomun farklı bölgelerini ayırt edebilmek için kullanılmaktadır. Genetik belirleyiciler tıbbi genetikte kullanım için pratiklik sunar. Bağlantı analiz yoluyla kromozomların belirli bölgelerdeki genlerinin haritalanması, genetik hastalıkta doğum öncesi tanı, genetik hastalıklarda heterozigot taşıyıcılığın belirlenmesi, koroner kalp hastalığı, kanser ve diyabet gibi yaygın yetişkin hastalıklara yatkın kişilerin yüksek ve düşük risklerin değerlendirilmesi adli tıpta ve babalık testinde kullanım ve organ nakli için doku tiplemesi tıbbi genetik kapsamı içindedir (77).

2.7. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

İlk kez 1985 yılında bilim dünyasına sunulduğundan itibaren Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR); hem araştırma hem de klinik laboratuvarlarda yeni bir çığır açmıştır. ABD'de Cetus Corporation'da çalışan Kary Mullis, Henry A. Erlich ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir. Dr. Kary B. Mullis 1980'li yıllarda yaptığı PCR buluşu ile 1993 yılında kimya alanında Nobel ödülü almıştır. PCR DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Yöntem basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasıdır. PCR bir çeşit in-vitro klonlamadır. PCR reaksiyonu, DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklık ile birbirinden ayrılması (denatürasyon) sentetik

oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyonu) sonra zincirin uzaması (polimerizasyon [çift iplikli DNA'ların sentezi]) ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon/hibridizasyon/polimerizasyon) bir PCR döngüsünü oluşturur. Her adım farklı sıcaklıklarda gerçekleşir (72). Bu teknikle; bir DNA hedefini 10^6 – 10^{12} arasında çoğaltmak mümkündür. Yöntemin temeli çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü bu bölgedeki baz dizilerini tanımlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır.

PCR tekniği çok az miktarlarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamaktadır. PCR tekniği ile laboratuvar tanısı arasında büyük hız ve kesinlik kazanılmış, birçok durumda radyoaktivite kullanımı gereksiz hale gelmiştir. PCR teknolojisi için DNA örneği, çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer, dNTP'ler, sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz enzimi ve uygun pH ve iyon koşulları sağlayan tampon karışımı gereklidir (73). Tekrarlanan denatürasyon, primer bağlanması ve DNA sentezi döngüleriyle orijinal DNA dizisinin çok sayıda benzer kopyası elde edilir. Aynı amaçla kullanılan DNA probe gibi teknikler, PCR'a göre çok daha az hassasiyete sahiplerdir (74).

PCR'in temel bileşenleri, kalıp DNA, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP (deoksiribonükleozid trifosfat) karışımı, tampon ve $MgCl_2$ 'dür (75).

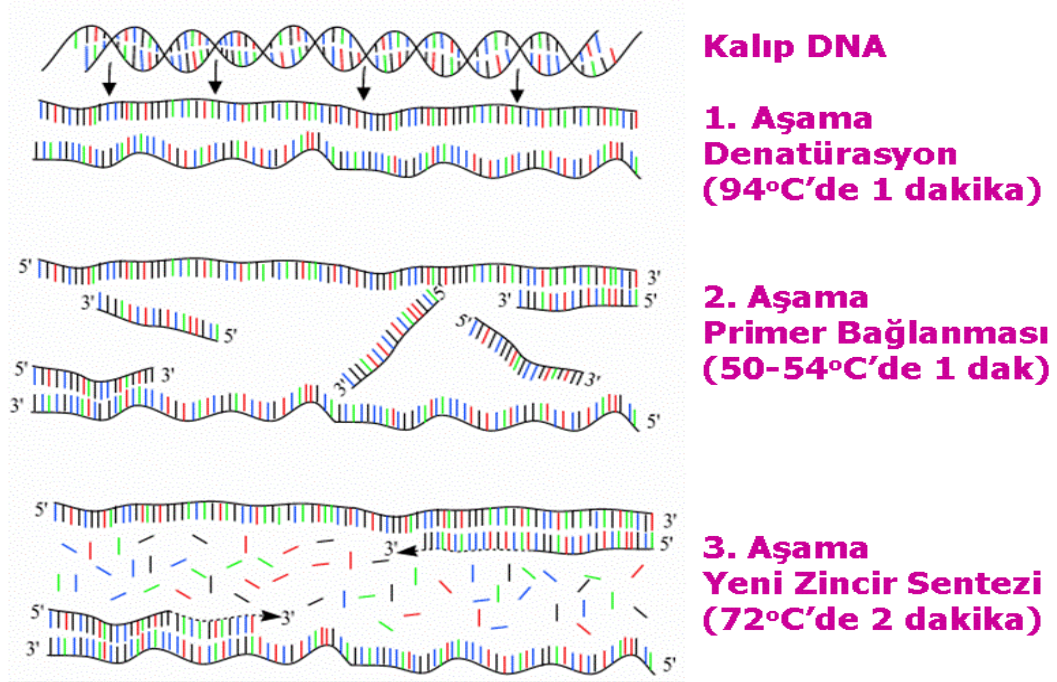
PCR aşamaları temel olarak 3 aşamada gerçekleşir (Şekil 2.7).

1- Denatürasyon: PCR'ın ilk basamağı, DNA iplikçiklerini ayrılması yani denatüre edilmesidir. Bu işlem, ortalama 94 – $95^\circ C$ 'de PCR karışımındaki iplikçiklerin birbirinden tamamen ayrılması sağlanana kadar, kısa bir süre devam ettirilir. Böylece primerler'in bağlanması için tamamlayıcı dizinlerin açılması sağlanır. Denatürasyon süresinin uzun olması, Taq polimeraz enziminin aktivitesindeki kaybı hızlandırmaktadır.

2- Primelerin birleşmesi: Reaksiyonun ikinci basamağı primerlerin birleşmesidir. Primer bağlanma sıcaklığı, PCR'ın başarısında önemli bir parametredir. Her bir oligonükleotid için karakteristik olan birleşme sıcaklığının belirlenmesinde, oligonükleotidin uzunluğu ve reaksiyon tamponunun iyonik gücü kadar primerin baz kompozisyonu da önemlidir. PCR karışımında bulunan $5' \rightarrow 3'$ yönündeki iki primer, denatürasyon sonrası birbirinden ayrılan iplikçiklerdeki kendi komplementer alanlarına

özel olarak bağlanır. Bu işlem 50–65°C’ de gerçekleştirilir. Birleşme sıcaklığının çok yüksek olduğu durumlarda primer bağlanması şekillenmezken, sıcaklığın çok düşük olduğu durumlarda da primerler yanlış yerlere bağlanabilir veya primer dimerleri oluşabilir. Bunun için optimal bağlanma sıcaklığının belirlenmesi gereklidir.

3- Polimerizasyon veya Extensiyon: Primer uzaması, genellikle 72°C’ de veya DNA polimerazın optimum sıcaklığında gerçekleştirilir. PCR’ ın genellikle 2 dakikalık bir uzama süresi tam uzamaya ulaşmak için yeterli bir süre olmakla birlikte, bu süre çoğaltılacak olan DNA bölgesinin uzun olması halinde arttırılabilir. Bu basamakta Taq DNA polimeraz enzimi 5’→3’ yönünde aktivite göstererek, primerlerin 3’ uçlarından başlamak üzere ortamdaki nükleotidleri de kullanarak hedef DNA dizisinin kopyasını yapar. Reaksiyon sıcaklığı tekrar yükseltilecek son uzama sıcaklığı 94°C’ ye çıkarılır ve ondan sonraki işlemler devam eder. Böylece 1 döngü tamamlanmış olur ve her döngüde DNA miktarı bir kat artar (76).



Şekil 2.7. PCR reaksiyonunun aşamaları

Sonuç olarak PCR reaksiyonu çok hassas ve çok küçük miktarlarda DNA kullanılarak modern genetiğin gelişmesinde büyük önem taşımaktadır. PCR, DNA ve RNA örneklerinin analizi için, araştırma laboratuvarlarının, klinik moleküler tanı, adli tıp ve kriminoloji laboratuvarlarının vazgeçilmezi olmuştur. Ayrıca, diğer nükleik asit analiz yöntemlerine göre daha hızlı, daha duyarlı ve daha az masraflıdır.

Buna karşın çok gelişmiş bir yöntem olmasına rağmen; bazı dezavantajları vardır. Hedef DNA'nın nükleotit dizisinin bilinmesi gerekliliği ve nispeten kısa bir ürün elde edilmesi, kontaminasyondan çok çabuk etkilenebilmesi dezavantajları arasında sayılmaktadır. Bu yüzden PCR çalışırken çok dikkatli ve özenli olunması gerekmektedir.

PCR sonrasında oluşan ürün, jel elektroforezinde bant boyutlarına bakılarak kontrol edilir. Jel elektroforezi yapılan işlemin hassasiyetine göre Agaroz ya da Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) olarak ayrılır.

Elektroforez

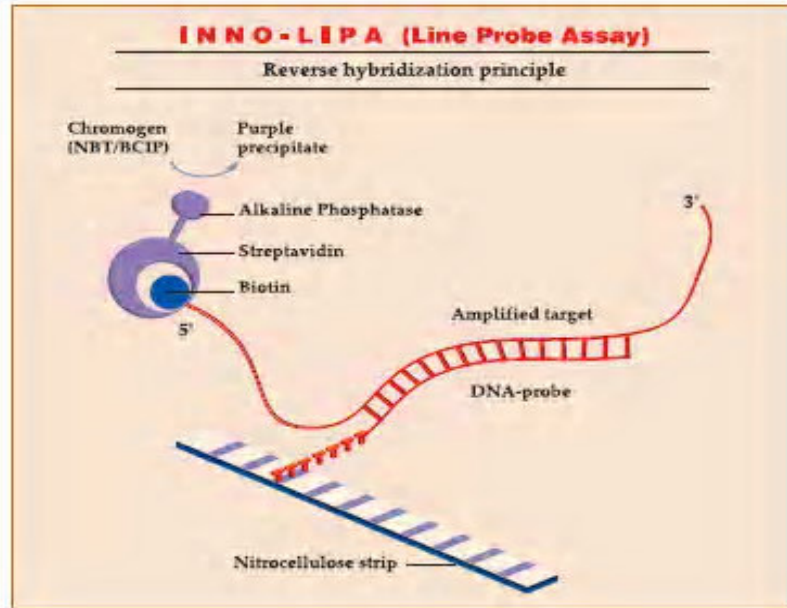
Elektroforez, belirli bir elektrik alanında iyonların hareketine dayalı ayırma tekniğidir. Pozitif yüklü iyonlar negatif elektroda; negatif yüklü iyonlar ise pozitif elektroda doğru göç ederler. İyonlar total yüklerine, boyutlarına ve şekillerine bağlı olmak üzere farklı göç etme oranına sahiptirler ve bu özelliklerinden yararlanılarak elektroforez ortamında birbirlerinden ayrılabilirler.

Jel elektroforezi moleküler biyolojinin en temel bileşenleri arasında yer almaktadır. 1970 yılında DNA moleküllerinde kullanılabileceğinin belirlenmesi ile birçok kolaylığı ve kullanım alanını da beraberinde getirmiştir. Agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi DNA ya da RNA moleküllerinin boyutlarını baz alarak ayırt etmede kullanılan bir tekniktir. Özellikle, DNA fragmanlarını ayırmak, tanımlamak ve saflaştırmak için kullanılır. Teknik basit ve birçok diğer prosedür (yoğunluk gradient santrifüjleme gibi) tarafından yeterli ayrımı yapılamayan DNA fragmanlarını ayırabilme yeteneğine sahiptir. Üstelik jel içerisinde DNA'nın lokasyonu, ethidiyum bromid gibi flüoresan boyaların düşük konsantrasyonları ile boyanarak doğrudan belirlenebilir. DNA molekülleri, proteinler ve diğer pek çok biyomoleküller belirli bir elektriksel yük taşır. DNA molekülü fosfat grubu taşıması nedeniyle negatif yüklüdür ve bu nedenle bir elektrik alanında negatif kutuptan pozitif kutba hareket eder. Bir molekülün hareket hızı şekline, büyüklüğüne, molekül ağırlığına ve net elektriksel yüküne bağlıdır. DNA

molekülleri şekilsel olarak benzer ve negatif yüklü olduğundan, bu kriterlere göre elektroforezle ayrılmazlar. Fakat DNA molekülleri büyüklüklerine, yani molekül ağırlıklarına bağlı olarak bir jel içinde ayrılabilirler.

Ters Hibridizasyon Tekniği

Bu teknik, birbirini takiben hibridleme ile PCR metoduna dayalıdır. Örneğin, CFTR geninin fragmentleri biyotinle işaretlenmiş özel primerlerle hasta DNA'sı çoğaltılır. Çoğaltılmış gen parçalarının karakterizasyonu, nitroselüloz stripler üzerine sabitlenmiş sekans-spesifik oligonükleotid problarıyla hibridizasyon reaksiyonundan gerçekleşir (ters hibridizasyon). Daha sonra biyotinlenmiş DNA örnekleri kimyasal olarak denatüre edilir ve tek iplikçik haline getirilerek spesifik oligonükleotid problarla membran temelli striplerle tespit edilir. Hibridizasyon sonrası streptavidin ile etiketlenmiş alkalın fosfat eklenir. Substrat solüsyonu ile inkübasyon sonucunda mor-kahverengi çökelti oluşur. Reaksiyon su ile durdurulur (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Testin prensibi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

1. Laminar Air Flow
2. Mikroskop
3. PCR cihazı
4. pH metre
5. Vorteks
6. Santrifüj
7. Hassas Terazî
8. Derin Dondurucu
9. Buzdolabı
10. Otomatik Pipet
11. Distile Su cihazı
12. Elektroforez sistemi
13. UV Transilliminator
14. Hibridizasyon/Yıkama Cihazı
15. Etüv
16. Distile su cihazı
17. Vorteks

3.1.2. Sarf Malzemeler

1. RPMI 1640
2. L-Glutamin
3. Phytohemaglutinin
4. Fetal Calf Serum
5. Heparin
6. Kolşisin
7. Penisilin/Streptomisin
8. Sodyum Hidrojen Fosfat
9. Amonyum Klorür
10. Potasyum Hidrojen Fosfat
11. Potasyum Hidrojen Karbonat
12. Potasyum Klorür
13. Glacial Asetik Asit
14. Metanol
15. Tripsin
16. Gurr Buffer
17. Giemsa
18. Amonyum Asetat
19. Etilendiami Tetra Asetik Asit (EDTA)
20. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
21. Borik Asit
22. Tris
23. Etanol
24. Ficoll
25. Bromofenol Blue
26. Xylene Cyanole FF
27. Etidyum Bromid
28. Agarose
29. DNA Boyut Marker
30. İzo-propanol
31. Ependorf tüpler
32. Buzluk
33. Distile su
34. Tüplük
35. Falkon tüpler
36. PCR tüpleri
37. dNTP set
38. MgCl₂
39. Taq DNA Polimeraz Enzimi
40. 10xPCR Tamponu
41. Primer setleri
42. CFTR tanı kiti

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hasta Seçimi

En az bir yıl boyunca herhangi bir korunma olmaksızın cinsel ilişkiye girmelerine rağmen çocuk sahibi olamayan, sperm analizleri ve ultrasonografik tetkikler sonucunda vas deferensleri olmayan hastalar çalışma grubuna alınmıştır. Hasta grubumuzda toplam 44 hastanın 29' unda çift, 15' inde tek taraflı vas deferensleri bulunmamaktadır.

3.2.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmada toplanan kan örnekleri 0,3 ml EDTA'lı tüplere ve 0,3 ml heparin çekilmiş enjektöre 5 ml kan alınmıştır. Bu periferik kan örneklerinden EDTA' lı tüplerdekiler DNA izolasyonu, heparinli kan örnekleriyle de kromozom analizinde kullanılmak üzere kan kültürü yapılmıştır.

3.2.3. Kan Kültür Yöntemi

3.2.3.1. Kan Ekimi

Kültür Medyumunun Hazırlanması

RPMI 1640	100 ml
Fetal Calf Serum	20 ml
Phytohemaglutinin	2 ml
L-Glutamin	1 ml
Penisilin/Streptomisin	1 ml

Bu ürünler karıştırılarak 5 ml' lik kültür tüplerine paylaştırılarak derin dondurucuda saklanır.

Metod

1. Her hasta için 37 °C' de ısıtılmış 5 ml medyum kullanılır.
2. Medyumlara 0,3–0,5 ml kan eklenir.
3. Tüpün kapağı kapatılır, altüst edilir ve 37 °C' de etüve kaldırılır. Ekim tarihi ve saati not edilir.

3.2.3.2. Kan Kültür Çıkarımı

Çoğalan hücreleri metafaz aşamasında yakalayarak kromozom analizi yapmak amacıyla kültürün sonlandırma aşamasıdır.

Kullanılan Sölüsyonların Hazırlanması

1. Hipotonik solüsyonu: 0,075 M KCl (2,796 KCl + 500 ml distile su)
2. İbrainov solüsyonu: 3 ml Metanol + 5 ml Glasiyel Asetik Asit + 92 ml distile su
3. Metanol
4. Fiksatif: 3 hacim metanol / 1 hacim Glasiyel asetik Asit

Metod

1. Ekim yapılan kültür tüplerinin her birine 70. saatte 75 µl kolşisin eklenir, altüst edilir ve etüve kaldırılır.
2. 30 Dakika sonra kültür tüpleri etüvden çıkartılır, 2000 rpm' de 4 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır.
3. Pellet resüspanse edilir. Üzerine 37 °C' lik etüvde ısıtılmış 7 ml hipotonik solüsyonu eklenir. Oda ısısında 2–4 dakika bekletilir. 2000 rpm' de 4 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Pellet resüspanse edilir.
4. Pellet üzerine oda ısısında bekletilmiş 5 ml İbrainov solüsyonu eklenir. Hemen 2000 rpm' de 4 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır, pellet resüspanse edilir.
5. Pellet üzerine 5 ml Metanol eklenir. Hemen 2000 rpm' de 4 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır, pellet resüspanse edilir.
6. Pellet üzerine soğuk Fiksatif eklenir. Preparasyon aşamasına geçilir.

3.2.3.3. Preparat Hazırlama

Metod

Çıkarım işleminden sonra -20 °C' de saklanan rezervler çıkarılır ve 2000 rpm' de santrifüj edilir. Süpernatantı atılır.

Daha önceden metanol içerisinde buzlukta saklanan ıslak soğuk lamalar alınır ve üzeri soğuk fiksatif ile yıkanır. Farklı yerlere gelecek şekilde 2–3 damla hücre süspansiyonundan damlatılır. Birkaç saniye beklenir ve tekrar üzeri soğuk fiksatif ile yıkanır.

Hastanın adı soyadı ve preparat numarası yazılır.

Hazırlanan preparatlar kuruması için 65 °C' de 1 saat 15 dakika bekletilir.

3.2.3.4. Bantlama

Kromozomların spesifik bantlarının elde edilmesi için tripsin muamelesi ile kromozomlarda açık ve koyu bölgelerin (bantların) oluşması sağlandı. Açık bölgeler ökromatin, koyu bölgeler heterokromatin bölgelerdir.

Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması

1. Tripsin Solüsyonu: 0,10 gr Tripsin 50 ml sorenson tamponu içinde çözdürülür.
2. Sorenson Tamponu: 18,94 Na₂HPO₄ + KH₂PO₄ 2 lt distile su içerisinde çözdürülür.
3. Gurr Tamponu: 1 tablet Gurr tableti 1 lt distile su içerisinde eritilir.
4. Giemsa: 10 ml Giemsa üzerine 90 ml Gurr tamponu eklenir.

Metod

Tripsin 5–10 sn

Sorenson Tamponu ile çalkalanır

Giemsa 6–7 dk

Distile su ile iki kere çalkalanır. Preparatlar artık analiz için hazırdır.

3.2.4. Kandan DNA İzolasyonu

Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması

1. Red Cell Lysis Solüsyonu

155 mM Amonyum Klorür

10 mM Potasyum Hidrojen Karbonat

1 mM EDTA

2. Cell Lysis Solüsyonu

25 mM EDTA

%2'lik SDS

3. Protein Presipitasyon Solüsyonu

10 M Amonyum Asetat

4. %70'lik Etanol

70 ml Etanol

30 ml Distile Su

Metod

1. 1 hacim kan üzerine 3 hacim soğuk red cell lysis solüsyonu eklenir, alt üst edilir ve 20 dakika oda ısısında bekletilir.
2. 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısmı atılır.
3. Dipte kalan lökosit pelleti iyice vortekste karıştırılır ve üzerine 1 hacim cell lysis solüsyonu eklenir. Yeniden vortekslendikten 37 °C'lik etüvde homojenize olana kadar bekletilir. (Örnekler homojenize olduktan sonra oda sıcaklığında 18 ay kalabilir).
4. Homojenize olduktan sonra üzerine 1/3 hacim protein presipitasyon solüsyonu eklenir. İyice vortekslenir. 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir.
5. Süpernatant kısmı, temiz falkon tüpündeki 8 ml izo-propanol üzerine alınır. Alt üst edilir, DNA görülür. 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
6. Süpernatant kısmı atılır, alttaki DNA pelleti %70'lik etanol ile yıkanır. 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir ve üstte kalan etanol atılır.
7. DNA oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra üzerine 200 µl distile su eklenir.

3.2.5. Moleküler Çalışma Basamakları

3.2.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA'nın PCR'da çoğaltılması AZF için ayrı, CFTR için ayrı PCR miksleri hazırlanmıştır. Her bir AZF bölgesi için ayrı primerler kullanılmıştır. CFTR için hazır tanı kiti kullanılmıştır.

AZF için PCR Protokolü

Y kromozomu mikrolelesyon analizinde kullanılacak bölgeler, European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) ve Clinical Molecular Genetics Society (CMGS) tarafından bir komisyon oluşturularak belirlenmiştir. Biz de, yukarıda adı geçen komisyonların önermiş olduğu AZF bölgeleri arasından AZF a, AZF b ve AZF c bölgelerinin her biri için 2'şer adet olmak üzere toplam 6 adet AZF bölgesini çalışmamıza dahil ettik. Çalışmamızda kullandığımız AZF bölgeleri, AZFa için: sY84, sY86; AZFb için: sY127, sY134; AZFc için: sY254, sY255'dir. Kontrol primerleri olarak, SRY (Sex determining region of the Y chromosome) ve ZFY (Zinc finger gene protein on the Y chromosome) kullanıldı. Kullanılan primerlerin ve ikili kombinasyonları ve PCR ürünlerinin bant boyutları tablo 3. 1. verilmiştir.

PCR miskinin hazırlanması

10 x PCR Tamponu	5 µl
dNTP (2.5 mM)	3 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
Primer 1 (10 pm)	3 µl
Primer 2 (10 pm)	3 µl
Taq DNA Polimeraz	0.5 µl
DNA	5 µl

En son distile su konularak son hacim 50 µl'e tamamlanır.

AZF için PCR Programı

94 °C	5 dk	} 40 siklus
94 °C	45 sn	
58 °C	40 sn	
72 °C	40 sn	

Tablo 3.1. Y kromozomundaki AZF a, b, c, SRY ve ZFY bölgelerine ait primer dizileri

sY84-P1	5' - AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT – 3'	AZF a	326 bp
sY84-P2	5'- GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC - 3'		
sY86-P1	5' - GTG ACA CAC AGA CTA TGC TTC - 3'		320 bp
sY86-P2	5' - ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT – 3'		
sY127-P1	5'- GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA -3'	AZF b	274 bp
sY127-P2	5' - CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA – 3'		
sY134-P1	5' - GTC TGC CTC ACC ATA AAA CG - 3'		326 bp
sY134-P2	5' - ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA - 3'		
sY254-P1	5' - GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA – 3'	AZF c (DAZ)	400 bp
sY254-P2	5'- GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C -3'		
sY255-P1	5' - GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT - 3'		126 bp
sY255-P2	5' - CTC GTC ATG TGC AGC CAC - 3'		
sY14-P1	5'- GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA - 3'	SRY	472 bp
sY14-P2	5'- GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG - 3'		
ZFY-P1	5'- ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACA C - 3'		495 bp
ZFY-P2	5'- GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAG T - 3'		

3.2.5.2. PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR işleminin akabinde hedef DNA bölgesinin çoğaltılmasının doğru şekilde kontrol edilmesi için PCR ürünleri jelde koşturulmalıdır.

3.2.5.2.1. Agaroz Jel Hazırlanması

Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

1. TBE Tamponu (10x)

- 108 gr Tris
- 55 gr Borik Asit
- 7,31 gr EDTA tartılarak dH₂O ile 1 lt'e tamamlanır. Stok olarak hazırlanan 10xTBE jel hazırlamada kullanılacağı zaman 1/10 oranında sulandırılır.

2. Etidyum Bromid (% 1'lik)

- 0,2 gr Etidyum Bromid hassas terazide dikkatlice tartılarak dH₂O ile 20 ml'e tamamlanır.

3. Yükleme TAMPONU (Loading)

- a) 3 gr Ficoll
- b) 50 mg Xylene Cyanole FF
- c) 2 gr Bromofenol Blue tartılarak dH₂O ile 20 ml'e tamamlanır.

% 3'lük Jel Hazırlanması

3 gr agarose tartılır, 1xTBE tamponu ile 100 ml'e tamamlanır, kaynatılarak eritilmesi sağlanır. Elin yanmayacak kadar soğutulduktan sonra 4,5 µl Etidyum Bromid eklenir ve karıştırılır. Jel kalıbına döküldükten hemen sonra kuyucuklar oluşması için tarak yerleştirilir ve jel donması için bırakılır.

3.2.5.2.2. PCR Ürünlerinin Jele Yüklenmesi

Jel donduktan sonra kap elektroforez tankına yerleştirilir ve tank içine 10xTBE tamponu kuyucuklar kapanacak mesafeye kadar konulur. Jelin ilk ve son kuyucuklarına DNA Boyut Marker'ı yüklenir. % 3'lik jelde 80 V' da 25 dakika PCR ürünleri koşturulur.

SRY: 472 bp, **ZFY:** 495 bp, **AZF a:** sY84: 320 bp – sY86: 326 bp, **AZF b:** sY127: 274 bp– sY134: 301 bp, **AZF c:** sY254: 400 bp – sY255: 126 bp 'de PCR ürünü verir.

Kistik Fibrozis Mutasyon Tarama Kiti Protokolü

Kistik fibrozisin genital formu olan CBAVD- CUAVD hastalarında sık görülen mutasyonlar için hazırlanmış olan İnno-Lipa CFTR19 tanı kiti kullanılmıştır. Sık görülen mutasyonlara göre dizayn edilmiş toplam 19 mutasyon aynı anda belirleyebilen ters hibridizasyon tekniğine dayalı bir line-probe testidir. Kit içerisinde bulunan striplere 37 adet prob hibridize olmuştur (Şekil 3. 1). Bu DNA parçaları CAVD' de en sık görülen CFTR gen mutasyonlarıdır. Bunlar F508del, G542X, I507del, G551D, R560T, R553X, W1282X, N1303K, Q552X, 3905insT, CFTRdele2,3(21kb), 711+1G→T, 3272-26A→T, 1898+1G→A, I148T, 3199del6, 3210+1G→A, S1251N, 1717-1G→A. Stripte mutasyonların wild-type (sağlıklı) bantlarının olmasıyla da ilgili mutasyonun heterozigot veya homozigot olduğu da anlaşılmaktadır. Kit protokolüne göre;

Testin Prensibi

Testin ilk adımı periferik kan örneklerinden DNA izolasyonudur. Elde edilen DNA'lar biotinlenmiş primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edilirler.

Kit içinde iki farklı primer bulunmaktadır: Part 1 ve Part 2

PCR Part 1		PCR Part 2	
Amplification Buffer	10 µl	Amplification Buffer	10 µl
Primer Part 1	10 µl	Primer Part 2	10 µl
Taq DNA polymerase	0,9 µl	Taq DNA polymerase	0,9 µl
Örnek DNA'sı	5 µl	Örnek DNA'sı	5 µl
dH ₂ O	24,15 µl	dH ₂ O	24,15 µl
Toplam hacim	50 µl	Toplam hacim	50 µl

PCR karışımları hazırlandıktan sonra 45 µl ilgili tüplere dağıtılır. Tüplerin üzerine 5 µl DNA eklenir. En son Promega bead enzimden her tüpe 2'şer adet dağıtılır ve Thermalcycler (PCR) cihazına yerleştirilir.

PCR Protokolü

95 °C	15dk	} 30 siklus
95 °C	1 dk	
57 °C	1 dk	
68 °C	1dk	
68 °C	10 dk	
+4 °C	∞	

PCR sonunda %2' lik agaroz jelde ürün yürütülüp PCR' ın çalışıp çalışmadığı kontrol edilir.

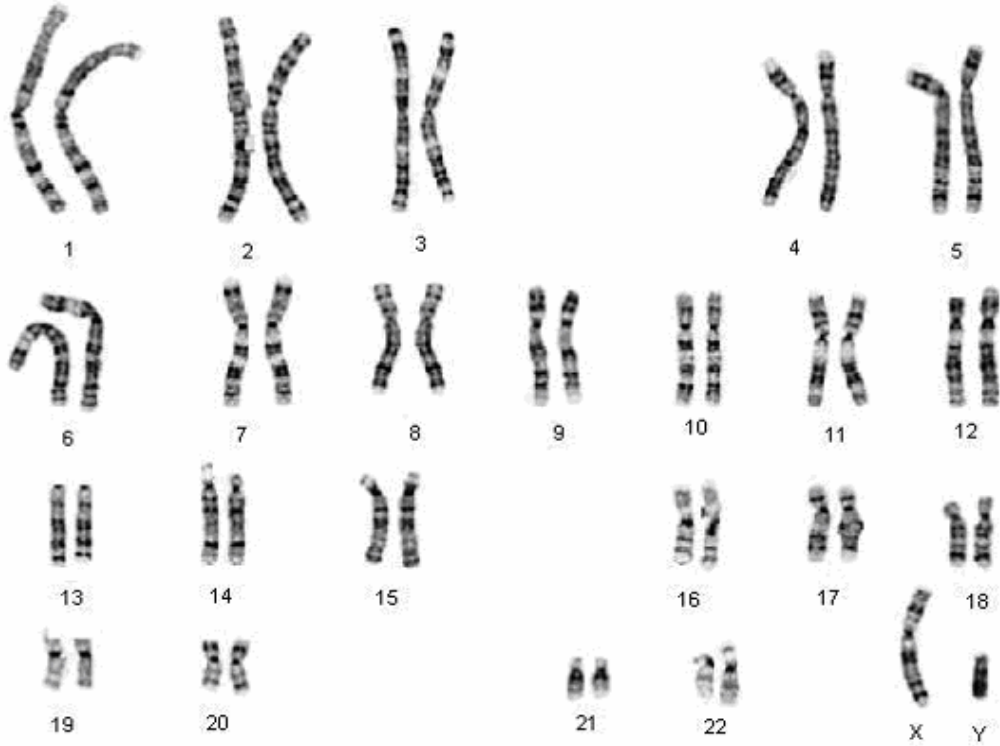
PCR işleminden sonra Auto-Lipa cihazında devam edilir. Auto-Lipa cihazı ile çalışmadan önce Fill System ve Auto Clean işlemleri yapılmalıdır. Kit içinden çıkan referans stripteki bandlarda 37 adet prob hibridize olmuştur. Nitroselüloz striplerde bulunan problarda mutasyon sekanslarının dizileri bulunmaktadır ve bu sayede heterozigotluk ve homozigotluk durumları belirlenebilmektedir.

Hibridizasyon sırasında, denatüre edilmiş ampikon stripe yapıştırılmış gen problemlerine bağlanır. Oldukça spesifik yıkama işlemi, sekans problemleri, çoğalmış DNA ile uyumlu ise hibridlerin hayatta kalmasını sağlar. Streptavidin alkalın fosfataz (kit içinden çıkan solüsyon) gen problemlerine ve biyotinle işaretlenmiş ampikona bağlanır. Bu kompleks yapı alkalın fosfatazdaki renk reaksiyonu ile tanımlanır. Bant yapısı sunulan örneklerle analiz edilebilir.

Strip üzerinde sadece wild-tip bant (sağlıklı) varsa hasta homozigot normal, sadece mutant-tip varsa homozigot mutant, her ikisinde varsa heterozigot olarak yorumlanır.

4. BULGULAR

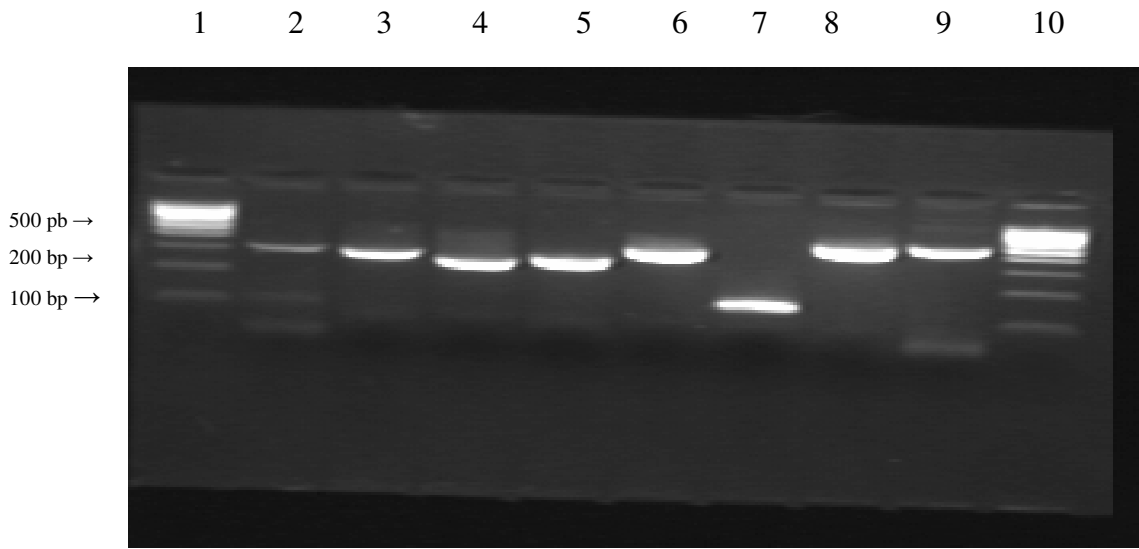
Bu çalışmada, vas deferens agenezis tanısı olan 44 infertil erkek hastada AZF ve CFTR geninin mutasyonlarına bakılmıştır. Erkek hastalar ortalama 34 yaşında olup, 29'unda çift taraflı, 15'inde de tek taraflı vas deferens bulunmamaktadır. Periferik kandan yapılan kromozom analizi sonucunda bütün hastalar normal karyotipte ve Y kromozomu normal görünümde bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 46,XY Normal erkek karyotipi

AZF bulguları

AZF bölgelerinden, AZF a' dan: sY84, sY86; AZF b' den: sY127, sY134; AZF c'den: sY254, sY255 bölgeleri tarandı. Kontrol primerleri olarak, SRY (Sex determining region of the Y chromosome) ve ZFY (Zinc finger gene protein on the Y chromosome) kullanıldı. Bölgelere özgü dizayn edilen primerler kullanılarak yapılan PCR ve akabinde yapılan jel elektroforezi sonrası (Şekil 4. 2) vas deferens agenezisi olan 44 hastada, söz konusu olan AZF bölgelerinde herhangi bir delesyona rastlanılmamıştır.



Şekil 4.2. AZF genlerinin jel elektroforezinde görüntüsü

1, 10: DNA Boyut Markeri

2,3; AZF a → sY84-sY86

4,5: AZF b → sY127-sY134

6,7: AZF c → sY254-sY255

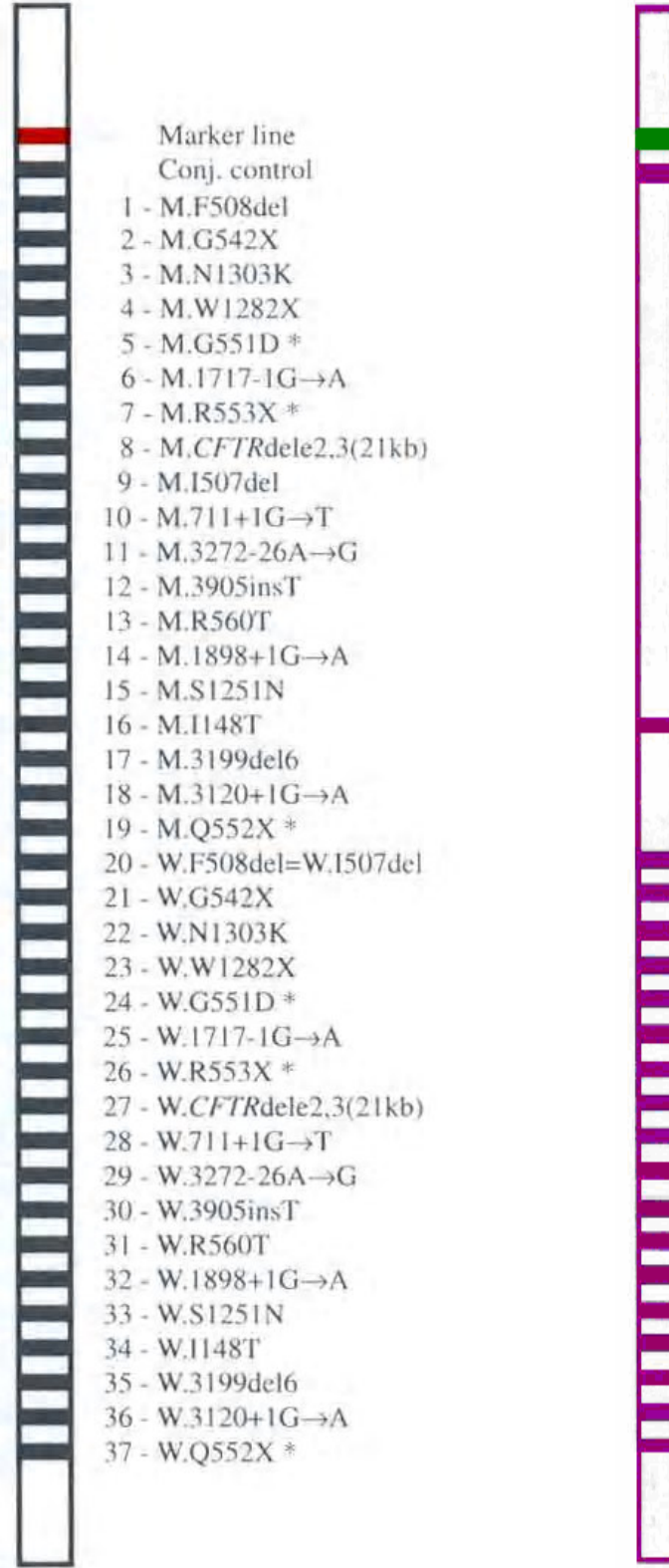
8,9: SRY ve ZFY

CFTR Gen Mutasyonları Bulguları

CFTR gen mutasyonları için İnno-Lipa CFTR19 tanı kiti kullanılmıştır. Bu kit ile CFTR geninde en sık görülen 19 farklı mutasyon, bir hastada aynı anda analiz edilmiştir. 44 hastanın ikisinde I148T ve birinde N1303K mutasyonları açısından heterozigot, diğer hastalar ise çalışılan 19 mutasyon açısından normal bulunmuştur (Şekil 4.3).

1

2



Şekil 4.3. Tanı kitinin içinden çıkan strip (1). Hibridizasyon sonrasında I148T heterozigot paterni, strip üzerindeki hem wild-type hem de mutant- type de patern alınmıştır (2).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnfertilite problemi kadın ve erkekte eşit oranda gözlenen ve toplumun %15–20' sini etkileyen bir sağlık problemidir.

Erkek infertilitesi birçok sebebe bağlıdır. Sperm üretim bozuklukları, sperm kanallarındaki tıkanıklıklar, sperme karşı antikor varlığı, testis travması, hormonal bozukluklar, anatomik problemler, varikosel, geçirilmiş hastalıklar, enfeksiyonlar ve bazı ilaçlar infertilite nedenleri arasında sayılabilir. İnfertiliteye yaklaşım, azosperminin nedenin epididimal kanallardaki tıkanıklıktan mı yoksa spermatogenezdeki defektlerden mi kaynaklandığı araştırılmalıdır.

Spermatogenez, bir dizi hücrel değişimleri içeren kompleks bir süreçtir. Spermatogenetik sürecin tüm aşamaları ve hormonal düzenlemesi iyi bir şekilde bilinmesine rağmen spermatogenezin genetik kontrol mekanizması hakkındaki bilinenler kısıtlıdır. Günümüzde, sayısal ve yapısal kromozomal anomalilerin cinsiyet karakteristik özelliklerinin gelişiminde ve buna bağlı olarak spermatogenezdeki önemi anlaşılmıştır.

Kayed ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) tedavisi önerilen 2650 çift kromozom analizi yapılmış ve 138 (%5,20) erkek hastada kromozom anomalisi bulunmuşlardır (101).

1444 infertil erkek arasında yapılan bir çalışmada Bourrouillou ve arkadaşları, % 7,6' sında kromozom anomalisi tespit etmişler ve kromozom anomalilerinin erkek infertilitesinde önemli olduğu fakat tek başlarına sebep olmadığı gen düzeyinde araştırılması gerektiğini öne sürmüşlerdir (102).

Kalantari ve arkadaşları primer infertilitesi olan 70 erkekte ise klasik sitogenetik yöntemi uygulamış ve kromozom analizi sonucunda %11,42' sinde anomali tespit etmişlerdir (103).

İdiyopatik infertilitesi olan hastalarda yapılan kromozom analizi sonucunda Ristavonic ve arkadaşları ile Jia ve arkadaşları bu hastalarda herhangi bir kromozom anomalisine rastlamadıklarını belirtmişlerdir (104,105).

Bu çalışmada da, kromozom analizi yapılan konjenital vas deferens agenezisi olan 44 infertil erkek hastada kromozom anomalisi rastlanmamıştır. Bu durum Ristavonic ve arkadaşları ile Jia ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalarla uyumlu iken Kayed, Bourroillou ve arkadaşlarının çalışmaları ile farklı bulunmuştur.

Bu sonuç, infertilitede geleneksel sitogenetik yöntemlerin gücünün yetersiz olduğunun, moleküler yöntemler ile sitogenetik yöntemlerin birlikte kullanılması gerektiğini düşündürmektedir.

İlk defa 1976'da Tiepolo ve arkadaşları azoospermik erkeklerde Y kromozomunun uzun kolunda sitogenetik olarak tespit edilemeyen geniş delesyonlar saptanmıştır ve bu delesyona uğrayan bölgelerin spermatogenezise spesifik olduğu düşünülmüş, 'Azoospermia Faktör' olarak adlandırılmıştır. AZF bölgesi, oluşan delesyonların meydana getirdiği fenotiplere göre AZF a, AZF b, AZF c bölgeleri olmak üzere 3 bölgeye ayrılmıştır.

Y kromozomu mikrodilesyon oranlarının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda delesyon bulunan olguların oranının %1 ile %55 gibi geniş bir aralıkta olduğu literatürde belirtilmektedir (51).

Van der Ven ve arkadaşları, 28 sequence-tagged site (STS) kullanarak yaptıkları çalışmada, ICSI programına alınan 204 azospermik ve oligozoospermik olgudan sadece iki (%0,98) hastada Y kromozom delesyonu taşıdığını belirtmişler ve oligospermik olgularda nadir görüldüğü sonucuna varmışlardır. Delesyon noktasının daha proksimalda olmasının distal bölgedeki bir delesyondan daha ciddi spermatogenez bozukluğuna yol açacağını ileri sürmüşlerdir (106).

Yapılan iki ayrı çalışmada, non-obstrüktif azospermisi ve şiddetli oligozoospermisi olan hastalarda 6 STS kullanarak AZF delesyonlarına bakmışlardır. Teloken ve arkadaşları % 12,5, Tse ve arkadaşları % 6,9 oranında AZF delesyonu bulduklarını bildirmişlerdir. Her iki çalışmada da en sık delesyonun AZF c bölgesinde olduğunu rapor etmişlerdir. (107,110).

Medica ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, 105 rastgele seçilmiş infertil hastadan sadece birinde (%0,95) Y kromozomu mikrolelesyonu bulmuşlardır (108).

13 azospermik hastaya kromozom analizi yapan Stipoljev ve arkadaşları, AZF mikrolelesyonları ve CFTR gen mutasyonları açısından değerlendirmiş ve herhangi bir anomali ya da mutasyona rastlamamışlardır. Ayrıca bu hastaların testiküler dokularından kromozom analizi yapılmış ve sadece CBAVD' li bir hastada 22. kromozomun uzun kolunun terminal bölgesine yakın (22q13) bir bölgede kırılma bulmuşlardır. Sonuç olarak obstrüktif ve non-obstrüktif hastaların testiküler dokularının incelenmesi gerektiğini söylemişlerdir (111).

Chen ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, ICSI adayı 92 çiftin AZF geni delesyonları açısından değerlendirmiş ve obstrüktif grupta delesyona rastlamamış, fakat non- obstrüktif grupta % 23 olarak bulmuşlardır. Sonuç olarak da; ICSI olmadan önce, obstrüktif azospermikler hariç, azospermik olan erkeklerin genetik test yapmalarını önermişlerdir (95).

Bu çalışmamızda, obstrüktif azospermisi olan hastalara 8 STS kullanarak AZF a, b ve c bölgelerine bakılmıştır. Herhangi bir delesyona rastlanılmamıştır. Bulunan sonuçlar literatürden çok farklı bulunsa da, Chen ve arkadaşları, Stipoljev ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalarla aynı sonuçlar elde edilmiştir. Literatürdeki oranlar arasındaki farklılıklar, başta çalışılan hasta grupları arasındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Zaten bizim çalışmamızla aynı gruplarla yapılan çalışmalarda da bizimle aynı sonuçlar bulunmuştur Sertic ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada erkek

infertilitesinde (özellikle non-obstrüktif azoospermiklerde) Y kromozomu mikrolelesyonları ve seks kromozom anomalilerinin, CAVD' lerde de özellikle CFTR gen mutasyonlarının görüldüğünü belirtmişlerdir (99). Farklılığın diğer bir nedeni, AZF'de bakılan bölgelerin ve primerlerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Bu farklılığı kaldırmak için ve bu konuda tam bir standardizasyonun sağlanabilmesi için Avrupa Androloji Akademisi ve Avrupa Moleküler Genetik kalite kontrol ağı (EAA/EMQN), AZF a, b ve c bölgesi için 6 adet STS' nin yeterli olacağını bildirmiştir. Bunlar: AZF a bölgesi için sY84 ve sY86, AZF b bölgesi için sY127 ve sY134, AZF c bölgesi için ise sY254 ve sY255' dir. Bu çalışmada kullanılan primerler EAA/EMQN' nin önerilerine uygun olarak seçilen primerlerdir. Kontrol primelerler olarak da SRY ve ZFY kullanılmıştır. Bundan sonraki yapılacak çalışmalarda sadece 6 STS kullanarak hassas bir çalışma yapılabileceği ve bu şekilde hem daha ekonomik hem de laboratuvarlar arasında doğan delesyon oranlarındaki farklılığın ortadan kaldırılması için önemli olduğu belirtilmektedir (112).

Türkiye' de yapılan çalışmalarda da ortalama % 15 oranında Y kromozomu mikrolelesyonları bulunmuştur. Hasta grupları arasındaki ve çalışılan bölgeler arasındaki farklılık burada da söz konusudur. Dünya literatürü incelendiğinde bu oran % 8 olarak kaydedilmiştir. Bu da populasyonlar arasında farklılığın oluşabileceğini desteklemektedir.

Son yıllarda gelişen genetik testler ve ultrasonografik incelemeler infertilite nedenleri arasında vas deferens agenezisinde CFTR gen mutasyonlarının önemli rol oynadığını göstermektedir. Konjenital vas deferens agenezisi, kistik fibrozis (CF) hastalığının genital formu olarak bilinmektedir. Kistik fibrozis geni yedinci kromozomda olup, 1480 aminoasit kodlayan 230 kb uzunluğundadır ve 27 ekzon içerir. CF membran geçirgenliğini düzenleyen protein (CFTR) olarak adlandırılan CF gen ürünü protein, temelde klor kanalı olarak görev yapar. Klinik ve genetik olarak heterojenite gösteren CF' de bugüne kadar sayıları 1500'e ulaşan mutasyonlar bildirilmiştir (67).

Uzun ve arkadaşları, Avusturya' da yaşayan konjenital çift taraflı vas deferens agenezisi olan (CBAVD) 22 hastada denatüre gradiyent jel elektroforezi (DGGE) ve DNA dizi analizi yöntemlerini kullanarak, CFTR gen mutasyonları sıklığını %31,8 olarak bulmuşlardır (97).

Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'da en sık görülen $\Delta F508$ mutasyonudur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda $\Delta F508$ mutasyonunun sıklığı ortalama %25 dolayındadır. Buna göre en az Türkiye, en fazla Danimarka'da $\Delta F508$ mutasyonu görülmektedir. CFTR mutasyonları populasyonlara göre değişiklik göstermektedir.

Dinic ve arkadaşları infertilitenin genetik nedenlerini bulmak amaçlı, 33 hastada CFTR gen mutasyonları ve Y mikrolelesyonlarını araştırmışlardır. Altı hastada CFTR gen mutasyonu bulmuşlar ve mutasyon sıklığının %18 olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak AZF ve CFTR gen mutasyonlarının prognostik değerinin önemli olduğu, fakat buradaki mutasyonların sperm kalitesinden tamamen sorumlu olmadıklarını rapor etmişlerdir (98).

ICSI önerilen, aşırı oligozoospermi ve azoospermisi olan 150 erkekte, Dohle ve arkadaşlarının yapmış oldukları genetik çalışma sonucunda 14'ünde (%12) CFTR gen mutasyonu bulmuşlardır (100).

Shulz ve arkadaşları 2006' daki çalışmalarında CBAVD' li hastalar arasında yapmış olduğu çalışmada, kromozom analizi sonucunda bir hastada 45,XY, der(14;22) bulunmuştur. Bütün hastaların AZF gen delesyonlarına bakılmış ve herhangi bir delesyona rastlanılmamıştır. CBAVD'li 597 hastadan 34'ünde (%5,70) $\Delta F508$ heterozigot olarak bulunmuşlar. Sonuç olarak, CFTR mutasyonları infertil erkeklerde kistik fibrozis transmembran iletim regülatör gen mutasyonlarının artmış frekansının azalmış sperm sayısı ile ilişkili olmadığını söylemişlerdir (91).

Türk populasyonuna yönelik yapılan başka bir çalışmada ise, Dayangaç ve arkadaşları CFTR mutasyonu taşıyan 51 CBAVD' li hastada, 27 farklı mutasyon bulmuşlardır. IVS8-5T ve D1152H mutasyonlarının predominant mutasyonlar olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak Türkiye 'deki CF nadir olarak görülse de, CBAVD'den major sorumlu CFTR gen mutasyonlarıdır. Bu yüzden mutasyon panellerinin populasyonlara özgü yapılmasını önermektedirler (92).

Radpour ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada hem bayanlarda hem de erkeklerdeki CFTR gen mutasyonları sonucunda görülen genital bozukluğu olan hastalar arasında en sık görülen 33 mutasyon açısından taramış ve CBAVD'li hastalarda % 10 oranında mutasyon tespit etmişlerdir (113).

Attardo ve arkadaşlarının vas deferens agenezisinin oluş sebebinin ortaya koymak için yaptıkları çalışmada, 37'si CBAVD ve biri CUAVD'li hastalarda kendi popülasyonlarına özgü en sık görülen CFTR gen mutasyonlarını tarama kiti kullanmışlar. CFTR geninin mutasyon sıklığını %48,6 olarak bulduklarını belirtmişlerdir. CBAVD'nin CFTR gen mutasyonları ile ilişkili olduğunu söylemişlerdir (61).

Bu çalışmada, seçilen 44 hastanın 15'inde tek, 29'unda çift taraflı vas deferens agenezisi vardır. AZF delesyonu ve kromozom anomalisi bulunmayan hastalardan çift taraflı vas deferens agenezisi iki hastada I148T ve bir hastada ise N1303K mutasyonu heterozigot olarak bulundu (%6,82). CFTR gen mutasyonlarıyla yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu çift taraflı vas deferens agenezisi olan hasta grupları arasında yapılmıştır. Sonuçlarımızı CBAVD'ler arasında değerlendirirsek mutasyon sıklığı %10' lara çıkmaktadır. Unilateral vas deferens agenezisi olanlarda ise herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Bu sonuçlar, literatürden çok farklılık göstermemektedir. Dinic ve Schulz' un özellikle Radpour' un yapmış olduğu çalışmalar ile uyumlu iken, Dayangaç ve arkadaşlarınıninkinden farklı bulunmuştur.

Literatürde yapılan birçok çalışma CBAVD'liler arasında olmaktadır ve CFTR mutasyonlarının etkisinin büyük olduğu söylenmiştir. Fakat aynı durum CUAVD için geçerli değildir. Çünkü CUAVD' de tek taraf zaten çalışmakta olup çoğu fertildirler. Eğer, hastanın her iki tarafında da agenezi olup biri pelvik veya ingiunal düzeyde kalmış ise onlarda CFTR gen mutasyonundan bahsedilir. Bu çalışmada ultrasound ile desteklenmiş tek taraflı vas deferensleri olmayan hastalarda literatürle uyumlu olarak CFTR bulamadık. Fakat bu hastalardaki infertilite probleminin neden kaynaklandığını bulabilmek için daha fazla mutasyona bakılması gerektiği kanısındayız.

Yapılan çalışmalarda vas deferens agenezisi olan hastalarda CFTR gen mutasyonlarının sıklığı, çeşidi ve AZF delesyonları oranı değişiklik göstermektedir. Bizim çalışmamız literatürdeki çalışmalara oranla daha az bulunmuştur. Muhtemel nedeni ise popülasyonlar arasındaki farklılıklarından, seçilen örnekler ve kullanılan tarama yöntemleri ve bakılan mutasyon sayısı ile ilişkilidir. Bu çalışmada ise mutasyonun az sayıda bulunması, baktığımız mutasyon sayısından (19 mutasyon) kaynaklanıyor olabilir. Mutasyon sayılarının artırılması ve özellikle bilinmeyen mutasyonları belirleyen tarama yöntemlerinin kullanılması ile de mutasyon çeşidi ve sayısı

artırılabilceği kanısındayız. Türk toplumunda bu çalışmada kullanılan mutasyonların yaygın olmadığı, hastalıkların bu mutasyonlar açısından taranmasının çok uygun olmadığını ama tarama yöntemleri ile bize uygun mutasyonların belirlenmesi gerektiğine inanıyoruz.

CFTR gen mutasyonları ile vas deferens agenezisi arasında güçlü bir ilişki olduğu düşünülmektedir. İnfertilite kliniğine gelen hastanın öncelikle infertilitenin neden kaynaklandığını bulabilmek için; hastadan kromozom analizi, AZF ve CFTR gen analizi yapılması önerilmektedir. Bu sonuçlara göre de, daha etkin yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) uygulanmasını sağlamaktadır. Örneğin hastada CAVD varsa Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE) veya Mikroskopik Epididimal Sperm Aspirasyonu (MESA) ya da Testiküler Sperm Aspirasyonu (TESA) uygulaması önerilmektedir. Bunun sonucunda da daha başarılı bir intra sitoplazmik sperm injeksiyonu olması beklenmektedir. CAVD hastası olan bir erkeğin mutlaka CFTR gen mutasyonlarına bakılması, mutasyon çıkması durumunda eşinin de bu gen açısından taranması önerilmektedir. Otozomal resesif bir hastalık olması nedeniyle her iki ebeveynde mutasyon açısından heterozigot ise çocuklarının da hasta olma olasılığı %25 olmaktadır. Bu çiftlere ideal olarak preimplantasyon genetik tanı ile embriyoların taranması önerilmelidir. Bu yüksek risk göz önüne alınarak genetik danışma almanın gerekliliği daha da artmıştır.

Sonuç olarak, vas deferens agenezisi olan hastalarda kromozom anomalisi ve AZF delesyonlarının daha az etkili olduğu, CFTR gen mutasyonlarının özellikle de CBAVD olan hastalarda çalışılmasının önemli olduğu kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

1. Kadioğlu A, ayan S, Semerci B, Orhan I, AŖı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M. Erkek reproduktif sistem hastalıkları ve tedavisi 2004; 232-237.
2. Tiepolo ve Zuffardi. Lokalization of factor controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. Hum Genet 1976;34: 119-24.
3. Kent-First M, Muallem A, Shultz j. Defining regions of the Y chromosome responsible for male infertility and identification of a fourt AZF region (AZFd) by Y chromosome microdeletion detection. Molec Reprodand Develop 1999; 53: 27-41.
4. Affara NA , Mitchell MJ. The role of human and mouse Y chromosome genes in male infertility. J Endocrinol Invest, 2000; 23: 630-645.
5. Lamb DJ. Debate: Is ICSI a genetic time bomb? Yes. J Androl 2003; 20:23-27.
6. Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempes H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. Reproduction 2003; 126:13-25.
7. Düzcan F, Atmaca M, Özcan G, Bağcı. H. Cytogenetic studies in patients with reproductive failure. Acto Obstet Gynecol Scand, 2003; 82: 53-56.
8. Stansfield W.D. Theory and problems of genetics. Schum.s outline series. McGraw-Hill, New York, 1958; 43-48.
9. Johnson MD. Genetic risks of ICSI in the treatment of male infertility. Recommendations for genetic counseling and screening. Fertil Steril 1998; 70: 397-411.

10. Van Asche E, Boundella M, Tournaye H. Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod.* 1996; 11 (4): 1-24.
11. Hargreave T. Genetic basis of male infertility. *B Med Bul* 2000; 3: 650-671.
12. Quinzii C, Castellani C. The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. *J Endocrinol invest*, 2000; 23: 684-690.
13. McCallum T, Milunsky J, Munariz R, Carson R, Sadeghi-Nejad H, Oates R. Unilateral renal agenesis associated with congenital bilateral absence of the vas deferens: phenotypic findings and genetic considerations. *Hum Reprod.* 2001; 16:282-286.
14. Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995;332: 1475-1480.
15. Bertuzzo CS, Punto Jr W. Molecular screening of CFTR gene in Brazilian men with bilateral agenesis of the vas deferens. *Human Fertil* 2006; 9: 53-56.
16. Rutland J, de long RU. Random ciliary orientation. A cause of respiratory tract disease. *N Engl J Med.* 1990; 323:1681-1687.
17. -Özdiler E, Aydos K. *Klinik Androloji.* Ankara, 2000; 71-101.
18. Elswawi MM, Pryor Jp, Klufio G, Barnes J, Patton MA. Genital tract function in men with Noonan syndrome. *J Med Genet.* 1994; 31: 468-472.
19. Osegbe DN, Akiyanju OO. Testicular dysfunction in men with sickle cell disease. *Postgrad Med J*, 1987;63: 95-100.
20. Bick D, Franco B, Sherins RJ, Heye B, Pike L, Crawford J. Brief report: intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome. *N Engl J Med* 1992; 326: 1752-1753.
21. Kolettis PN, Sandlow JI. *Clinical and Genetic Features Of Patients With Congenital Unilateral Absence Of The Vas Deferens.* Elsevier Science Inc. 2002; 60: 1073-1076.
22. Dauin M, Bieth E, Bujan L, Massat G, Pontonnier f, Mieuxset R. Congenital bilateral absence of the vas deferens: Clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations and implications for genetic counseling. *Fertility and Sterility* 2000; 74: 1164-1174
23. CLIA web sitesi: www.hcfa.gov/medical/clia/clia-home.htm
24. Kruriger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson JR, Matta JF, Ohenginner S. Predictive value of abnormal sperm morphology in vivo fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49: 112-117

25. Jiang mc, Lien YR, Chen S, et al. Transmission of de novo mutations of the deleted in azoospermia genes from a severely oligozoospermic male to a son via intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 1999; 71; 1029-1032
26. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W: *Histology: A Text and Atlas*, 4th edn, Lippincott Williams-Wilkins, Philadelphia 2003; pp 689-696
27. Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT. Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology* 2003; 59:73-86
28. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*, Pennsylvania, W.B. Saunders Company 1997; pp 406-412
29. Edwards RG, Brody SA. Spermatogenesis, ejaculation and spermatozoa. In *principles and practice of assisted human reproduction* 1995; pp 49-108
30. Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Yq microdeletions--azoospermia factor candidate genes and spermatogenic arrest. *J Biomol Tech.* 2004; 15:176-83.
31. Kadioğlu A, Cayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MO, Usta MF, Kendirci M. *Erkek Reprodüktif Sistem hastalıkları ve Tedavisi*. İstanbul: Acar Matbaacılık; 2004.
32. Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J. Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are 73 undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2001; 76: 479-484.
33. Lipshultz LI, Howards SS. *Infertility In The Male*. Third Edition. USA: Mosby; 1997.
34. Ali S, Hasnain SE. Molecular dissection of the human Y-chromosome. *Gene.* 2002; 283: 1-10.
35. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2001; 22: 226-239.
36. Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, Ross A, Kiesewetter F, Pryor J, et al. Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 3848-3853.
37. Ali S, Hasnain SE. Genomics of the human Y-chromosome. 1. Association with male infertility. *Gene.* 2003; 321: 25-37.
38. Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, Gligorievska N, Zorn B. Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Hum Reprod.* 2002;1 7: 17-24.
39. Lahn BT, Page DC. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 1997; 278:675-680

40. Ken McElreavey and Csilla Krausz. Male Infertility and the Y Chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 64:928-933
41. Koşar, Erkek infertilitesi S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 2007;14(3): 52-61
42. Thangaraj K, Gupta NJ, Pavani K, Reddy AG, Subramanian S, Rani DS, et al. Y chromosome deletions in azoospermic men in India. *J Androl.* 2003;24:588-597.
43. Raicu F, Popa L, Apostol P, Cimponeriu D, Dan L, Ilinca E, et al. Screening for microdeletions in human Y chromosome--AZF candidate genes and male infertility. *J Cell Mol Med.* 2003;7:43-48
44. Kostiner DR, Trek PJ ve Reijo RA. Male infertility: Analysis of the Markers and Genes on the Y Chromosome. *Hum. Reprod.* 1998; 13(11):3032-3038
45. Ferlin, E Moro, A Rossi, B Dallapiccola, C Foresta. The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *Journal of Medical Genetics* 2003; 40:18-24
46. Ferlin A, Moro E, Garolla A, Foresta C. Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum Reprod.* 1999;14:1710-1716.
47. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 2003; 423:825-837.
48. Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van Der Veen F, Oates RD, et al. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet.* 2002;71:906-922.
49. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet.* 2001;29:279-286
50. Hucklenbroich K, Gromoll J, Heinrich M, Hohoff C, Nieschlag E, Simoni M. Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum Reprod.* 2005;20:191-197
51. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl.* 2004; 27:240-249

52. Saxena, R.; Brown, L. G.; Hawkins, T.; Alagappan, R. K.; Skaletsky, et al. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nature Genet.* 1996; 14: 292-299
53. Reijo RA, Dorfman DM, et al. DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus cytoplasm at meiosis in humans and mice. *Biol Reprod* 2000; 63: 1490-1496
54. Girardi SK, Mielnik A and Schlegel PN. Submicroscopic Deletions in the Y Chromosome of Infertile Men 1997; 12(8):1635-1641
55. Layman LC. Genetic causes of human infertility. *Endocrinol Metab ClinNorth Am.* 2003; 32(3):549-572
56. Androloji Web Sites: <http://www.androloji.info/CBAVD.php>
57. Lyon A, Bilton D. Fertility issues in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* 2002; 3(3):236-240
58. Scotet V, Barton DE, Watson JB, Audrezet MP, McDevitt T, et al. Comparison of the CFTR mutation spectrum in three cohorts of patients of Celtic origin from Brittany (France) and Ireland. *Hum. Mutat.* 200; 22(1):105
59. Devaney J, Glennon M, Farrell G, et al. Cystic fibrosis mutation frequencies in an Irish population. *Clin Genet.* 2003; 63(2):121-125
60. Kerem B, Chiba-Falek O, Kerem E. Cystic fibrosis in Jews: frequency and mutation distribution. *Genet Test.* 1997;1(1):35-39
61. Attardo T, Vicari E, Mollica F, et al. Genetic, andrological and clinical characteristics of patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Int J Androl.* 2001 Apr; 24(2):73-79
62. Dean M, Will K, Stuhmann M, Schmidtke J. Alternative Splicing in the First Nucleotide Binding Fold of CFTR. *Hum. Mol. Gen.* 1993; 2:231-235
63. Cuppens H, Cassiman JJ. CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. *Int J And* 2004; 27: 251-256
64. Mennicke K, Klingenberg RD, Bals-Pratsch M, Diedrich K, Schwinger E. Rational approach to genetic testing of cystic fibrosis (CF) in infertile men. *Andrologia* 2005; 37: 1-9.
65. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, et al. Genomic DNA Sequence of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene. *Genomics* 1991; 10:229-235

66. Riordan JR. The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Annual Rev. Physiol.* 1993; 55:609-630
67. Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, et al. Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens: A Primarily Genital Form of Cystic Fibrosis. *JAMA* 1992; 267; 1794-1797
68. Hantash FM, Redman JB, Sun W, Strom CM, et al. Novel and recurrent rearrangements in the CFTR gene: clinical and laboratory implications for cystic fibrosis screening. *Hum Genet.* 2006; 119/1-2:126-136
69. Uzun S. Konjenital Bilateral Vas Deferens Aplazi (CBAVD)'li hastalarda Kistik Fibroz (CF) Genindeki Nokta Mutasyonlarının Araştırılması: CBAVD, CF İlişkisi. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul 2000
70. Coca-Prados M, Sanchez-Torres J, Civan MM, et al. Chloride Transport and Cl⁻ Channels: Transcripts and Single Channels events of Cl⁻ Channels in Human Nonpigmented Ciliary Epithelial Cells. *Wien Klin. Wochenschr* 1997; 109/12-13:517-518
71. Paranjape SM, Zeitlin PL. Atypical Cystic Fibrosis and CFTR-Related Diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2008
72. Taylor GR. Polymerase Chain Reaction: Basic Principle and Automation. In: Mc Pherson MJ; Qurkie P, Taylor GR, eds. *A practical approach.* Oxford University Press 1991; UK. Chapter 1:14
73. Başaran N. Tıbbi Genetik. Güneş & Nobel Kitapevi. 1997 (7.Baskı) 300, 292-296
74. McPherson MJ, Moller SG. PCR. 1th Ed., BIOS Scientific Pub., Lim. Trowbridge U.K., 2000 Chapter 3.
75. Arı Ş. DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması. In: *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler.* Ed.: Temizkan G, Arda N. Nobel Tıp Kitabevleri 2004 (2.Baskı); Türkiye. Bölüm 5.
76. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry.* 3rd Ed., Lippincott Williams & Wilkins U.S.A.,2005; Chapter 32.
77. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Boerkoel III CF. *Thompson & Thompson Tıbbi Genetik.* Güneş Kitapevi 2005 (6. Baskı) 87-93
78. Popli K, Stewart J. Infertility and its management in men with cystic fibrosis: review of literature and clinical practices in the UK. *Hum Fertil (Camb).* 2007; 10(4):217-21

79. Radpour R, Gourabi H, Gilani Mas, et al. Correlation between CFTR Gene Mutations in Iranian Men with Congenital Absence of the Vas Deferens and Anatomical Genital Phenotype. *Journal of Andrology* 2007; 1-10.
80. Colpi GM, Negri L, Mariani ME, Aydos K, et al: Male distal genital tract ultrasonography in excretory infertility. *Prog Reprod Biol Med.* 1992, 15: 119-129
81. 81.Okutman-Emonts Ö. İnfertil erkeklerde AZF bölgelerini kapsayan Y kromozom mikrolelesyon taraması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova-İzmir 2001
82. Li H, Ding X, Zhao J, Zuo M, Xiong C. Y chromosome microdeletions of 664 Chinese men with azoospermia or severe oligozoospermia. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2008 Jun; 25(3): 252-255.
83. Karpman E, Williams DH 4th, Wilberforce S, Lipshultz LI. Compound genetic abnormalities in patients with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutation. *Fertil Steril.* 2007; 87(6):1468.e5-8.
84. Ozdemir O, Gul E, Kilicarslan H, et al. SRY and AZF gene variation in male infertility: a cytogenetic and molecular approach. *Int Urol Nephrol.* 2007; 39(4):1183-1189.
85. Mau Kai C, Juul A, McElreavey K, et al. Sons conceived by assisted reproduction techniques inherit deletions in the azoospermia factor (AZF) region of the Y chromosome and the DAZ gene copy number. *Hum Reprod.* 2008 Jul; 23(7):1669-1678.
86. Dork T, Dworniczak B, Aulehla-Scholz C, et al. Distinct spectrum of CFTR gene mutations in congenital absence of vas deferens. *Hum Genet* 1997; 100(3-4):365-77.
87. Jarvi K, McCallum S, Zielenski J, Durie P, et al. Heterogeneity of reproductive tract abnormalities in men with absence of the vas deferens: role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *Fertil Steril* 1998; 70(4):724-728.
88. Cremonesi L, Ferrari M, Belloni E, et al. Four new mutations of the CFTR gene (541delC, R347H, R352Q, E585X) detected by DGGE analysis in Italian CF patients, associated with different clinical phenotypes. *Hum Mutat.* 1992; 1(4):314-319.
89. Bozon D, Zielenski J, Rininsland F, Tsui LC. Identification of four new mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: I148T, L1077P, Y1092X, 2183AA-->G. *Hum Mutat.* 1994; 3(3):330-332.
90. Suaud L, Yan W, Rubenstein RC. Abnormal regulatory interactions of I148T-CFTR and the epithelial Na⁺ channel in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(1):C603-611.

91. Schulz S, Jakubiczka S, Kropf S, et al. Increased frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males. *Fertil Steril*. 2006; 85(1):135-138.
92. Dayangaç D, Erdem H, Yılmaz E, et al. Mutations of the CFTR gene in Turkish patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod*. 2004 May;19(5):1094-1100.
93. Zamani AG, Dursun HG. Y kromozomu: Azospermia Factor (AZF) bölgesi, genler ve infertilite. *Selçuk Tıp Derg* 2006; 22: 81-87
94. Ge YS, Zhou YL, Wu HN. Molecular cytogenetic studies of 25 males with azoospermia. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuen Za Zhi* 2008; 25(2):190-194
95. Chen SU, Lien YR, Ko TM, et al. Genetic screening of karyotypes and azoospermic factors for infertile who are candidates for ICSI. *Arch Androl*. 2003; 49(6):423-427
96. Bor P, Hindkjaer J, Ingerslev HJ. Y chromosome microdeletions and cytogenetic findings in unselected ICSI candidates at Danish fertility clinic. *J Assist Reprod. Genet*. 2002; 19(5):224-231
97. Uzun S, Gökçe S, Wagner K. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Tohoku J Exp Med*. 2005; 207(4):279-285
98. Dinic J, Kusic J, Nolic A, et al. Analysis of Y chromosome microdeletions and CFTR gene mutations as genetic markers of infertility in Serbian men. *Vojnosanit Pregl*. 2007; 64(4):253-256
99. Sertic J, Cvitkovic P, Myers A, et al. Genetic markers of male infertility: Y chromosome microdeletions and cystic fibrosis transmembran conductance gene mutations. *Croat Med J*. 2001; 42:416-420
100. Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, et al. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod*. 2002; 17(1):13-16
101. Kayed HF, Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Amer AE, et al. Screening for chromosomal abnormalities in 2650 infertile couples undergoing ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006; 12(3):359-370
102. Bourrouillou G, Mansat A, Calvas P, Pontonnier F, Colombies P. Chromosome anomalies and male infertility: A study of 1,444 subjects. *Bull Assoc Anat (Nancy)* 1987; 7(215):29-31

103. Kalantari P, Sepehri H, Behjati F, Ashtiani ZO, Akbari MT. Chromosomal studies of male infertility. *Genetika* 2003; 39(3): 423-426
104. Ristanovic M, Bunjevacki V, Tulic C, Novakovic I, Nikolic A. Molecular analysis of Y chromosome microdeletions in idiopathic cases of male infertility in Serbia. *Genetika* 2007; 43(6):850-854
105. Jia YF, Wu AH, Qiu Y, Qu JY, Song CZ. Azoospermia factor microdeletions in idiopathic azoospermia and severe oligozoospermia. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2006; 12(2):108-111
106. Van der Ven K, Montag M, Preschka B, Leygraal J, Scwanitz G, Haidi G, Van der Van H. Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mol Hum Reprod* 1997; 3(8): 699-704
107. Teloken C, Arent A, Chammas M, Bertaiolli V, Marques DS, Badalotti M. Microdeletions of Y chromosome genes in infertile men. *Elsevier International Congress Series* 2004; 173-176
108. Medica I, Gligorievska N, Prenc M, Peterlin B. Y microdeletions in the Istria county, Croatia. *Asian J Androl* 2005; 7(2):213-216
109. Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A, Foresto C. Molecular and clinical characterization of Y Chromosome Microdeletions in infertile Men: A 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 92(3):762-770
110. Tse JYM, Yeung WSB, Lau EYL, Ng EHY, So WWK, Ho PC. Deletions within the azoospermia factor subregions of the Y chromosome in Hong Kong Chinese men with severe male-factor infertility: controlled clinical study. *HKMJ* 2000; 6(2):143-146
111. Stipoljev F, Vujisic S, Parazajder J, Hafner D, Jezek D, Sertic J. Cytogenetic analysis of azoospermic patients: karyotype comparison of peripheral blood lymphocytes and testicular tissue. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006; 124(2):197-203
112. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl* 2004; 27: 240-249
113. Radpour R, Gourabi H, Vosough Dizaj A, Holzgreve W, Zhong XY. Genetic Investigations of CFTR Mutations in Congenital Absence of Vas Deferens, Uterus and Vagina as a Cause of Infertility. *J Androl*. 2008 Jun 20. [Epub ahead of print]

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Kayseri’de doğdu. İlköğrenimini Ahmetpaşa İlkokulu’nda, orta öğrenimini Dedeman İlköğretim Okulu’nda ve lise öğrenimini ise Kayseri Süper Lise’sinde tamamladı. 2000 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans öğrenimine başladı. 2004 yılında Moleküler Biyoloji ve Genetik kümesinden başarıyla mezun oldu. 2005 yılında Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında iş hayatına devam etmektedir.

E-mail: mgonal@erciyes.edu.tr