

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Gizem AZİZOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2024-ANTALYA

ERKEK İNFERTİLİTESİ VE STPG2 GENİ
EKSPRESYONU ARASINDAKİ BAĞLANTININ
ARAŞTIRILMASI

Gizem Azizoğlu

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ERKEK İNFERTİLİTESİ VE STPG2 GENİ
EKSPRESYONU ARASINDAKİ BAĞLANTININ
ARAŞTIRILMASI

Gizem AZİZOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2022-6152 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2024-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. / /

İmza

Tez Danışmanı : Prof Dr Sibel BERKER KARAÜZÜM
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç Dr Ayşe Esra MANGUOĞLU
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof Dr Nedime SERAKINCI
Uluslararası Kıbrıs Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / tarih ve / sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci

Gizem AZİZOĞLU

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Eğitimimin başından beri bilgisi, sabrı ve desteğiyle yanımda duran, en çıkmaz noktalarda bile çözüm yolu yaratarak tez projemin ilerleyişini sağlayan, çalışma disiplini ve zerafetiyle her alanda kendime örnek aldığım çok değerli danışman hocam Sayın Prof Dr Sibel BERKER KARAÜZÜM'e,

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve fikirlerini benimle paylaşan, güler yüzü ve desteğini hiç bir zaman esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç Dr Ayşe Esra MANGUOĞLU'na,

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak bana destek olan, akademik hayatıma katkıda bulunan tüm değerli Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma, asistan arkadaşlarıma,

Lisans dönemimde elimden tutarak hiç bırakmayan, bana zorluklardan kaçmamayı öğreten, ne zaman ihtiyacım olsa tecrübe ve tavsiyelerini benimle paylaşarak yoluma ışık tutan çok değerli hocam Sayın Prof Dr Nedime SERAKINCI'ya,

Tez çalışmamın biyolojik örneklerinin toplanması sırasında yardım ve destek sağlayan Akdeniz Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı, Cerrahi Tıp Bilimleri öğretim üyesi Sayın Dr Ahmet Ender CAYLAN ve asistan doktor ekibine,

Tez projemin tamamlanmasında büyük rol oynayan, sıcak kanlı tavırlarıyla projeme maddi, manevi ve bilimsel katkılarını esirgemeyen başta İntergen Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi kurucu başkanı Prof Dr Serdar Ceylaner, Ar-Ge müdürü Sayın Dr Bora Ergin ve Ar-Ge ekibine,

Projemin istatistik çalışmalarında bana destek sağlayan Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç Dr Kemal Hakan Gülkesen'e,

Beni aralarına alarak bilgilerini paylaşan, tez projem boyunca yanımda olarak beni destekleyen sevgili Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi çalışanlarına, özellikle sabırlı ve ilgili yaklaşımıyla biyolog Ebru Kalay'a,

Hayatımın her anında bir emniyet ağı gibi arkamda duran, düştüğümde beni kaldırarak kendime olan inancımı kaybetmeme izin vermeyen, sevgi dolu canım annem Gaye AZİZOĞLU'na, beni bugünlere yetiştiren, artık yanımda olamasalar da destekleri ve güvenlerini hep hissettiğim sevgili dedem Orhan AZİZOĞLU ve sevgili anneannem Şerif AZİZOĞLU'na, her koşulda yanımda olan canım abim Orhan AZİZOĞLU ve tüm aileme,

En içten dileklerim, sevgi ve saygılarımla sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: İnfertil erkeklerin büyük bir kısmı sebebi bilinmeyen (idiyopatik) infertilite kategorisinde bulunmaktadır. Son yıllarda gelişen moleküler yöntemlerle gen düzeyinde çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışmada, *STPG2*, *GTSF1* ve *RNF8* genlerinin ekspresyonu ile erkek infertilitesi arasındaki bağlantıların araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: 31'i idiyopatik, 9'u sebebi belli infertil olmak üzere toplamda 40 infertil erkek bireyden testis dokusu ve kan, 32 fertil erkek bireyden ise kan örnekleri alınmıştır. Örneklerin total RNA izolasyonu yapıp cDNA elde edilmiştir. *STPG2* geninde yapılan qRT-PCR çalışmalarından sonuç elde edilememesi üzerine 8'i sebebi belirlenmiş ve 8'i idiyopatik infertil olmak üzere 16 doku örneğinden transkriptom (RNAseq) çalışması yapılmıştır. Gruplar arasında farklılık göstermiş olan *GTSF1* ve *RNF8* genleri seçilmiş ve qRT-PCR yöntemi ile ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Elde edilen bulguların ΔCq değerleri kullanılarak istatistiksel analizleri yapılmıştır.

Bulgular: RNAseq analizleri sonucunda *STPG2* geninin gruplar arasında ekspresyon farklılığı göstermediği bulunmuştur. qRT-PCR ile yapılan çalışmalarda fertil ve infertil bireylerin kan örneklerinde *GTSF1* geninde ekspresyon değişimi gözlemlenmezken, *RNF8* geninin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. İki gende de idiyopatik ve sebebi bilinen infertil dokular arasında fark gözlenmezken, patolojik tanılarına göre karşılaştırıldığında, her iki gende de dokularda ekspresyon farkı belirlenmiştir.

Sonuç: İdiyopatik infertil bireylerle kontrol bireyler arasında *STPG2* geninde ekspresyon farklılığı saptanmamıştır. *GTSF1* gen ekspresyonu sadece patolojik tanısı “Sertoli Cell Only” (SCO) olan hasta grubunda düşüş gösterirken, *RNF8* gen ekspresyonunun sadece SCO tanılı olguların doku örneklerinde değil, infertil ve fertil bireylerin kan örneklerinde de farklılığının belirlenmesi, *RNF8* geninin aday bir biyobelirteç olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: erkek infertilitesi, idiyopatik, gen ekspresyonu, qRT-PCR, RNAseq

ABSTRACT

Objective: A large number of infertile men are diagnosed with “idiopathic infertility”, the reason behind their infertility is unknown. Recently, due to improved molecular methods, genetic studies on male infertility increased. This study is aimed to investigate the relationship between the candidate genes; *STPG2*, *GTSF1*, *RNF8* and male infertility.

Method: Testicular tissue and blood samples from 40 infertile men; 31 diagnosed with idiopathic infertility and 9 with known causes, and blood samples from 32 fertile men were collected. Following total RNA isolation from the samples, cDNA was synthesized. The results obtained from Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) studies on *STPG2* were inconclusive. Transcriptome (RNAseq) analysis was conducted on 16 tissue samples, 8 with identified causes and 8 with idiopathic infertility. Following RNAseq, *GTSF1* and *RNF8* genes that showed differential expression among groups, were selected for further investigation. Subsequently, their expression levels were measured using qRT-PCR method. Statistical analysis was conducted using obtained ΔCq values.

Results: No results were obtained from the qRT-PCR studies on *STPG2*, and RNAseq analysis showed no differential expression. While no expression changes were observed for *GTSF1* in blood samples from fertile and infertile individuals via qRT-PCR studies, a significant difference was detected in expression of the *RNF8* gene. No difference was observed in the expression of both genes between idiopathic infertile and control tissues with known causes. However, when grouped by pathological diagnosis, expression differences were observed in tissues for both genes.

Conclusion: No expression difference was detected in *STPG2* between idiopathic infertile individuals and control subjects. The expression of the *GTSF1* gene showed a decrease only in the "Sertoli Cell Only" (SCO) patient group. Differences were identified in the *RNF8* gene expression in tissue samples of SCO-diagnosed cases and in blood samples of infertile and fertile individuals which indicates that *RNF8* gene could be a candidate biomarker.

Key words: Male infertility, idiopathic, gene expression, qRT-PCR, RNAseq

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Erkek Üreme Sistemi Anatomi ve Fizyolojisi	3
2.1.1 Erkek Üreme Sistemi Genel Mekanizması	4
2.1.2 Spermatogenez	7
2.1.3 Sperm Olgunlaşması ve Motilitesi	10
2.2 Erkek İnfertilitesinde Yaygın Bozukluk ve Anomaliler	10
2.3 Azospermik Erkek İnfertilitesinde Genetik Faktörler	15
2.3.1 Kromozomal Anomaliler	15
2.3.2 Y Kromozom Mikrodelesyonları	16
2.3.3 Monogenik Mutasyonlar	17
2.3.4 Epigenetik Faktörler	18
2.4 Erkek İnfertilitesinde Aday Genler	20
2.4.1 <i>STPG2</i>	20
2.4.2 <i>RNF8</i>	22
2.4.3 <i>GTSF1</i>	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1 Hasta Seçimi ve Örneklerin Toplanması	27
3.2 Total RNA İzolasyonu	27
3.2.1 Dokudan Total RNA İzolasyonu	27
3.2.2 Kandan Total RNA İzolasyonu	28

3.3 Total RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü.....	29
3.4 Revers Transkriptaz enzimi ile cDNA sentezi.....	29
3.5 cDNA Örneklerinin Spetrofotometrik Ölçümü.....	31
3.6 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeriz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	31
3.7 Jel Elektroforez.....	32
3.8 Transkriptom RNA Dizileme.....	33
3.9 İstatiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR.....	35
4.1 <i>STPG2</i> Geni Ekspresyon Bulguları.....	35
4.2 Transkriptom Çalışması ile Belirlenen Aday Genlerin Bulguları.....	38
4.3 <i>RNF8</i> ve <i>GTSF1</i> Genleri Cq Değeri Bulguları.....	41
4.4 <i>RNF8</i> ve <i>GTSF1</i> Genleri Δ Cq Değeri Bulguları.....	48
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR.....	64
EKLER.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	78

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1	Erkek infertilitesi sebepleri.....	11
Tablo 2.2	Johnsen Skorlama Sistemi.....	13
Tablo 3.1	Revers transkripsiyon kit malzemeleri.....	30
Tablo 3.2	cDNA sentez reaksiyonu adımları.....	30
Tablo 3.3	Ampliqon RealQ Plus 2x Master Mix Green with High ROX™ kit reaksiyon içeriği.....	31
Tablo 3.4	qRT-PCR basamakları.....	32
Tablo 3.5	Gen bölgeleri için tasarlanan primer dizileri.....	32
Tablo 4.1	Hasta Listesi ve patolojik değerlendirmeler.....	36
Tablo 4.2	<i>RNF8</i> ve <i>GTSF1</i> genlerinin ortalama Cq değerleri.....	42
Tablo 4.3	Araştırılan genlerin hasta ve kontrol kanlarında Cq değerlerinin normal dağılım ve karşılaştırmalı analizi.....	43
Tablo 4.4	İnfertil bireylerin kan örneklerinde tanısal ekspresyon farklılıkları için yapılan istatistiksel testler.....	45
Tablo 4.5	İnfertil bireylerin doku örneklerinden elde edilen Ct değerlerinin tanısal gruplar arasında değerlendirilmesi.....	46
Tablo 4.6	İnfertil bireylerin doku örneklerinden elde edilen Cq değerlerinin patolojik tanılarına göre karşılaştırılması.....	47
Tablo 4.7	qRT-PCR reaksiyonu bulgularının ΔCq değerleri.....	49
Tablo 4.8	İnfertil ve fertil erkek bireylerin kan örneklerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	50

Tablo 4.9	İdiyopatik infertilite ve sebebi belli olan infertilite hastalarının kan ve doku örneklerinin istatistik test sonuçları.....	51
Tablo 4.10	İnfertil hastaların patolojik tanılarına göre gruplandırılan doku ve kan örneklerinde gen ekspresyon farklılıklarının istatistiksel test sonuçları.	52
Tablo 4.11	Gruplara göre hesaplanan ortalama rölatif ekspresyon değerleri.....	55



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1	Embriyonik dönemde ürogenital sistemin cinsiyetlere göre farklılaşması.....	3
Şekil 2.1.2	SOX9 geninin regülasyonu ve testis oluşumunda oynadığı rol.....	4
Şekil 2.1.3	Erkek üreme sistemi iç ve dış organları ve testis yapısı.....	5
Şekil 2.1.4	Seminifer tübüllerinin iç yapısı ve spermatogenezin sertoli hücreleri arasında ilerleyişi.....	6
Şekil 2.1.5	Spermatogenez basamakları.....	9
Şekil 2.1.6	Olgun spermatozoa hücresinin yapısı.....	9
Şekil 2.2	Testis biyopsi örneklerinin patolojik tanıları.....	14
Şekil 2.3.1	Y kromozomu azospermik faktör (AZF) gen bölgeleri.....	16
Şekil 2.3.2	Spermatogenez basamakları ve bu basamaklarda rol oynayan genler.....	18
Şekil 2.3.3	Epigenetik sapmaların spermatogenez ve erkek infertilitesi üzerindeki etkisi.....	19
Şekil 2.4.1	STPG2 geninin 4 numaralı kromozomdaki yeri ve insan dokularındaki ekspresyon seviyeleri.....	21
Şekil 2.4.2.1	RNF8 geninin altı numaralı kromozomdaki yeri ve insan dokularındaki ekspresyon seviyeleri.....	23
Şekil 2.4.2.2	RNF8 geni ubiquitinasyon mekanizması.....	23

Şekil 2.4.3	<i>GTSE1</i> geninin onikinci kromozomdaki yeri ve insan dokularındaki ekspresyon seviyeleri.....	25
Şekil 4.1	Çalışmada denenen <i>STPG2</i> primer2 ve primer3 ve kontrol geni <i>β-aktin</i> 'in qRT-PCR çalışma örnekleri.....	37
Şekil 4.2	Şekil 4.1'de grafikleri verilen PCR reaksiyon ürünlerinin agaroz jel'de görüntüleri	38
Şekil 4.3	Fertil ve infertil bireylerde RNAseq gen ekspresyon dağılımları.....	39
Şekil 4.4	SCO bireylerin RNAseq gen ekspresyon grafikleri.....	40
Şekil 4.5	Proje dahilinde araştırılan hedef genler ve kontrol genin qRT-PCR çalışmalarından örnekler.....	41
Şekil 4.6	<i>RNF8</i> ve <i>GTSE1</i> genlerinin infertil ve fertil bireylerde kan örneklerinden çalışılan qRT-PCR testleri sonuçlarının sıra ortalamaları.....	44
Şekil 4.7	<i>GTSE1</i> ve <i>RNF8</i> genlerinde patolojik olarak gruplandırılan doku örneklerinin Cq değerleri farklılıklarının boxplot grafikleri.....	48
Şekil 4.8	İnfertil ve fertil grupların kan örnekleri <i>GTSE1</i> ve <i>RNF8</i> genlerinde ΔCq değerleri karılaştırması.....	50
Şekil 4.9	Patolojik tanılarına göre gruplandırılan doku örneklerinin ΔCq değerleri arasındaki farklılıklar.....	54

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	: Derece Celsius
AMH	: Anti-Müllerian Hormon
AZF	: Azospermi Faktör
bp	: Baz Çifti
cDNA	: Komplementer DNA
CFTR	: Kistik Fibroz Transmembran Regülatörü
-CH3	: Metil Grubu
Cm	: Santimetre
Cq	: Eşik Döngüsü (Cycle Threshold)
DHH	: Desert Hedgehog
dk	: Dakika
DMRT1	: Doublesex ve Mab-3 ile İlgili Transkripsiyon Faktörü 1
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNMT	: DNA Metiltransferaz
DNMT1	: DNA Metiltransferaz 1
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
E3	: Ubikitin Ligaz Grubu
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EtBr	: Etidyum Bromür

EUA	: Avrupa Üroloji Birliği
FGF9	: Fibroblast Büyüme Faktörü 9 (Glia Aktive Edici Faktör)
FGFR1	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1
FGFR2	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 2
FHA	: Forkhead – Associated Domain (Çatal-kafa ile ilişkili alan)
FHS	: Floating-Harbor Sendromu
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GATA4	: Transkripsiyon Faktörü GATA-4
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GTE_x	: Genotip Doku Ekspresyon Projesi
GTSF1	: Gametosit Spesifik Faktör 1
H19	: H19 RNA Geni
H2A	: Histon H2A
H2AX	: Histon H2Ax
H2B	: Histon H2B
H3	: Histon H2A
H3K27	: H3 histonda 27. pozisyondaki lizin aminoasitin epigenetik modifikasyonu
H3K9	: H3 histonda 9. pozisyondaki lizin aminoasitin telomerik bölge epigenetik modifikasyonu
H4	: Histon 4

H4K16	: H4 histonda 16. pozisyonunda lizin aminoasitin epigenetik modifikasyonu
KAL1	: Kallman Sendromu 1
KS	: Kallman Sendromu
LH	: Luteinleştirici Hormon
MDC1	: DNA Hasarı Kontrol Noktası 1
MEST	: Mesoderm Spesifik Transkript
Mg	: Milli gram
miRNA	: mikroRNA
ml	: Milli litre
MOF	: Asetiltransferaz
MSCI	: Mayoz Cinsiyet Kromozomu İnaktivasyonu
MTHFR	: Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi (USA)
ncRNA	: Kodlamayan RNA
ng	: Nanogram
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
nm	: Nanometre (Dalga boyu)
NR5A1	: Steroidojenik Faktör 1
OMIM	: Online Mendelian Inheritance in Man (NCBI)

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
piRNA	: Piwi-etkileşimli RNA
PTGDS	: Prostaglandin-H2 D-izomeraz
qRT-PCR	: Kantitatif Real Time PCR
RNA	: Ribonükleik Asit
RNAseq	: RNA Dizileme
RNF8	: Ring Finger Protein 8
RNF8-KO	: Ring Finger Protein 8 – Knock Out
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RT	: Revers Transkriptaz
SCO	: Sertoli Cell Only
siRNA	: Susturucu RNA
sn	: Saniye
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizm
SOX9	: SRY-Box Transcription Factor 9
SRY	: Cinsiyet belirleyici bölge Y
STPG2	: Sperm Tail PG- Rich Repeat Containing 2
TBE	: Tris/Borate/EDTA Tamponu
TE	: Tris – EDTA Tamponu
TESE	: Testiküler Sperm Ekstrasyonu

ubH2AX : Ubikitinlenmiş H2AX Histonu

WES : Tam Ekzom Dizileme

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

WT1 : WT1 Transcription Factor

μl : Mikrolitre



1. GİRİŞ

Halk arasında kısırlık olarak bilinen infertilite, cinsel olarak aktif bir çiftin bir yıl veya daha uzun bir süre boyunca düzenli ve korunmasız cinsel ilişki sonucunda gebelik elde edememesi olarak tanımlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yayınlanan son rapora göre infertilite yaklaşık olarak 6 yetişkinden birisini, yani toplumun ortalama %17.5'lik oranını etkilemektedir (<https://www.who.int/news/item/04-04-2023-1-in-6-people-globally-affected-by-infertility>, Erişim tarihi: 28 Aralık 2023). Ülkemizde yapılmış çalışmalar sonucunda infertilite oranının evli çiftlerde %10-20 arasında olduğu bildirilmiştir. Görülen bu vakaların neredeyse yarısında ise erkek faktörleri rol oynamaktadır.

Erkeklerde infertilitenin farklı mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıkabildiği bilinmektedir. Bu mekanizmaları; sperm üretimi problemleri (azospermi), sperm aktarımı problemleri, cinsel birleşme ile ilgili aksaklıklar, hormonal problemler ve anti-sperm antikor oluşumları olmak üzere gruplandırabiliriz. Bu problemler birçok farklı yolla ortaya çıkabilmektedir. Sperm üretimi problemleri genetik sebepler, testis gelişim bozuklukları, varikosel veya radyasyon kaynaklı olabilirken, sperm blokajı; vasktom, enfeksiyon veya prostat sorunlarından kaynaklı olabilir. Cinsel birleşme ile ilgili problemlere örnek olarak ise; ereksiyon ve ejakülasyona bağlı bozukluklar, bazı ilaçların kullanımı, sinirlerde hasar ve bu hasarlara yol açabilecek olan omurilik yaralanmaları gösterilebilir. Hormonal problemler doğuştan olabildikleri gibi anabolik steroid kullanımı ya da hipofiz bezinde tümör oluşumundan kaynaklı da olabilir. Son olarak sebebi belirsiz bir şekilde de ortaya çıkabilen anti-sperm antikorlar, vasktom sonucunda veya epididimide oluşan yaralanma ve enfeksiyonlar nedeniyle de ortaya çıkabilmektedirler (Ghanbari ve ark., 2020).

Günümüze kadar yapılan araştırmalar, tüm infertilite vakalarının sebeplerini aydınlatmak için yetersiz kalmaktadır. Vakaların %30 - %60 gibi büyük bir bölümünü sebebi bilinmeyen (idiyopatik) infertilite oluşturmaktadır. Bilinen genetik faktörler ise %1.2 olarak belirlenmiştir (Naz & Kamal, 2017; Grande ve Foresta, 2023). OMIM'de 200'ün üzerindeki genetik hastalık, erkek infertilitesi ile ilişkilendirilirken, spermatogenezde 3

bin'den fazla genin rol oynadığı bilinmektedir. Yoğun bir şekilde çalışılan bir konu olmasına rağmen infertilite ile bağlantılı genler ve bu genlerin oynadıkları rollerin henüz %0.01'inin değerlendirilebildiği belirtilmektedir (Digumarthi ve ark., 2021).

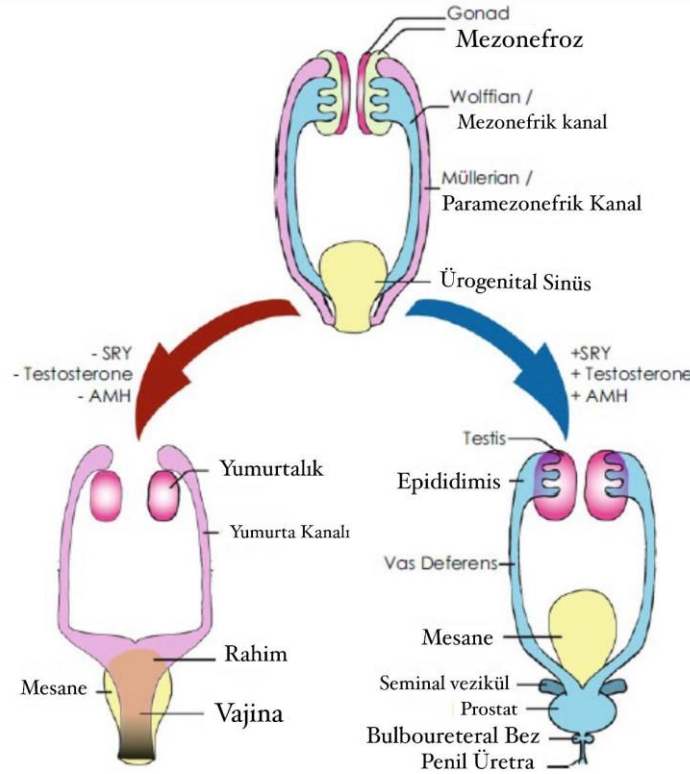
İnfertilitede rol oynayan genetik faktörler sadece genomik DNA'da meydana gelen mutasyon ve değişimlerle bağlantılı değildir. Genlerin ekspresyonları DNA dizisinde değişime sebep olmayan epigenetik faktörler doğrultusunda da değişebilirler. Erkek infertilitesinin patofizyolojisinde epigenetik faktörlerin değişiklikleri de rol oynamakta ve muhtemelen bazı "idiyopatik" erkek infertilite vakalarından sorumlu tutulmaktadır (Neto ve ark., 2016).

Mekanizması çözülmemiş, idiyopatik infertilitelere aday gen araştırmaları tanı ve tedavilerin ilerleyiş sürecinde temel bir gerekliliktir. Bu gereklilikten yola çıkarak yaptığımız çalışmada 18-55 yaş arasında 40 infertilite tanısı almış erkek bireyden testis doku ve kan örneği, ve aynı yaş aralığında, çocuk sahibi olmuş 32 fertil erkek bireyden kan örneği alınarak bahsi geçen dokularda erkek infertilitesinde sorumlu olabilecek *STPG2* geninin ve literatürde erkek infertilitesinde aday gen olarak tanımlanmış olan *RNF8* ve *GTSF1* genlerinin kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) yöntemi ile ekspresyon analizlerinin yapılarak, hedeflenen bu genlerin ekspresyon düzeylerinde kontrol ve hasta grubu arasında fark belirlenmesi durumunda infertilite sebeplerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine de katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

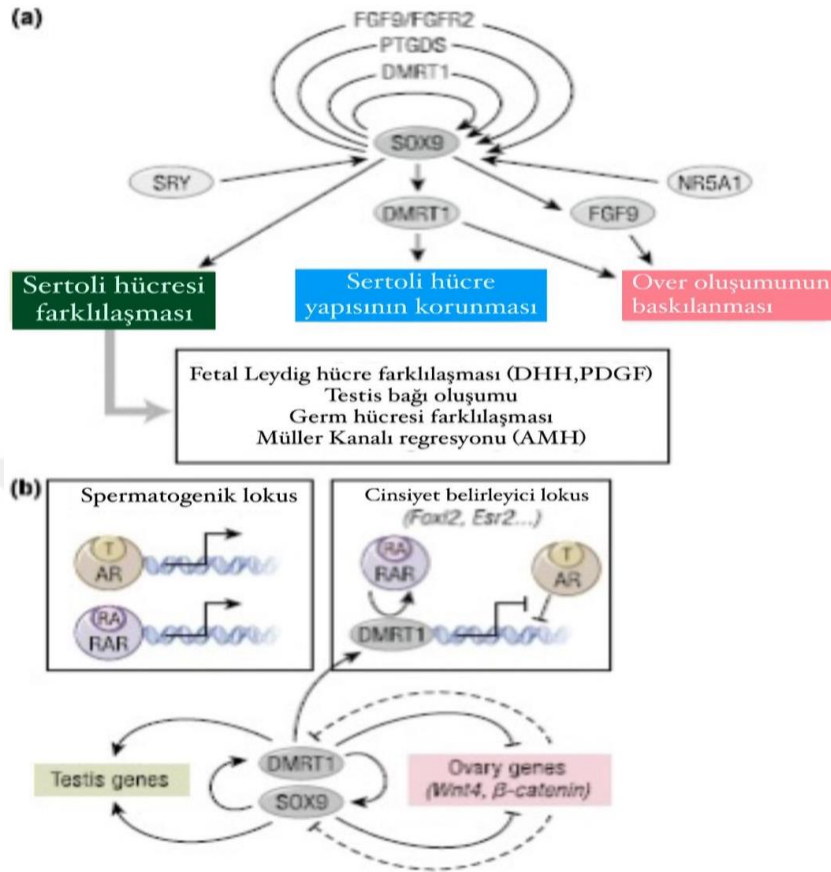
2.1 Erkek Üreme Sistemi Anatomi ve Fizyolojisi

Temel görevi sperm üretimi ve üretilen spermilerin uygun koşullarda saklanması sağlayarak, yumurtaya ulaştırılması olan erkek üreme sistemi, merkezi sinir sistemi ile de bağlantılı, pelviste yer alan iç ve dış organlardan oluşan kompleks bir sistemdir. Erkek üreme sisteminin oluşumu, Y kromozomu üzerinde bulunan *SRY* gen aktivasyonunu takiben embriyo formasyonunun 5'inci haftasında başlamaktadır (şekil 2.1.1) (Wu et al., 2020; Scribner ve Tadros, 2021).



Şekil 2.1.1: Döllenme sonrası embriyonik dönemde ürogenital sistemin cinsiyetlere göre farklılaşması gösterilmiştir. *SRY* geni bulunan embriyoda testis ve erkek genital yapıları oluşumu gözlenirken *SRY* geni bulunmayan embriyoda yumurtalık ve kadın genital yapıları oluşmaktadır. (Pask, 2016)

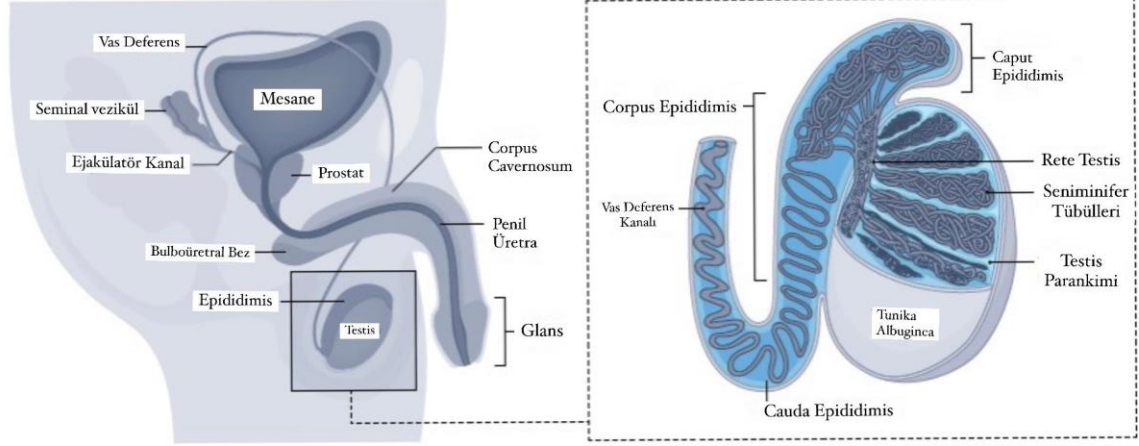
SRY geninin aktivasyonunda rol oynayan 3 ana gen; *GATA4*, *NR5A1*, *WT1* olarak belirlenmiştir. *SRY* geninin ekspresyonu ise *SOX9* geni ekspresyonunu upregüle ederek testis oluşum yollarını aktive eder (şekil 2.1.2) (Mäkelä ve ark., 2018; Pask, 2016).



Şekil 2.1.2: (a) Şekilde SOX9 geninin regülasyonu ve testis oluşumunda oynadığı rol şematize edilmiştir. SOX9, SRY geni tarafından aktive edilir ve daha sonra PTGDS, FGF9/FGFR2, and DMRT1 genleri ile ekspresyonunu sürdürür. Testis gelişiminin devamını sağlamanın yanı sıra SOX9; FGF9 ve DMRT1 aracılığı ile over oluşum yollarını da baskılayarak over oluşumunu engeller. DHH ve AMH genleri de SOX9 geni ile birlikte erkek genital organlarının oluşumunda kritik rol oynayan genlerdir. DHH, testosteron üretimi yapan leydig hücrelerin oluşumunu sağlarken, AMH geni ise dişi genital organı olan Müller kanalının oluşumunu engeller. (b) Şeklin bu kısmında testiküler fenotipin korunmasını sağlayan yollar gösterilmiştir. DMRT1 ve SOX9 genleri postnatal süreçte de over yapısında aktif olan genleri baskılayarak testis yapısının korunmasını sağlarlar. (Mäkelä ve ark., 2018)

2.1.1 Erkek Üreme Sistemi Genel Mekanizması

Erkek üreme sistemini oluşturan 3 ana yapı vardır. Bu yapılar; testis, sperm taşıma kanalları ve salgı bezleri olarak tanımlanmaktadır (<https://emrebakircioglu.com/erkek-ureme-sistemi-anatomisi>, Erişim tarihi: 03.02.2024). Erkek üreme sistemi yapısı ve organları şekil 2.1.3’de gösterilmiştir.

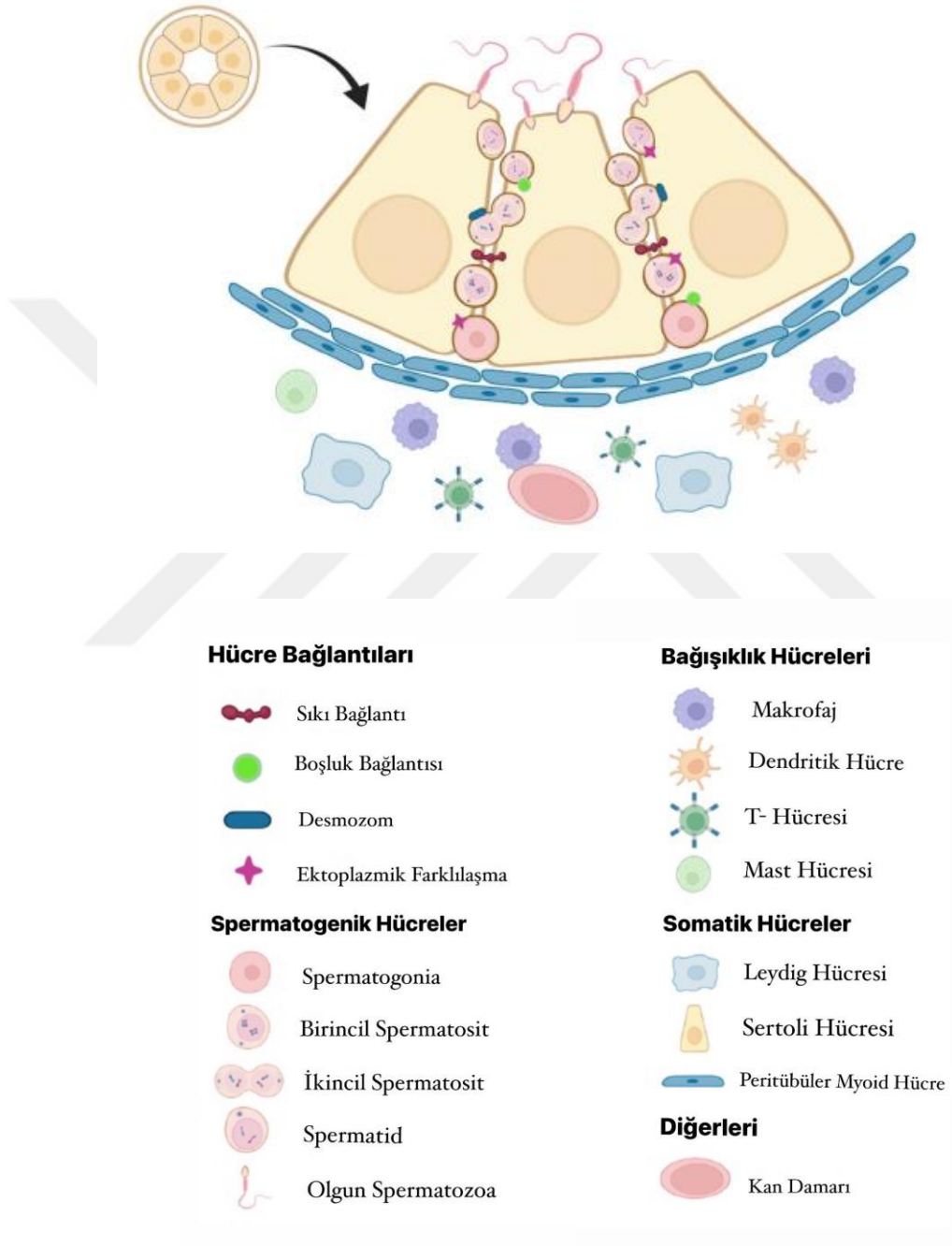


Şekil 2.1.3: Erkek üreme sistemi iç ve dış organları ve testis yapısı şekilde gösterilmiştir (Eisenberg ve ark., 2023).

Bu sistemin en önemli organı, sperm üretiminin yer aldığı testislerdir. Ortalama testis boyutu 4.5 ile 5.1 cm uzunluğunda ve hacmi ise 15 ile 25 ml arasında değişebilmektedir. Normal şartlarda her erkek bireyde testisler sağ ve sol olmak üzere iki adet bulunur. Anne karnında gelişim sırasında testisler pelvik bölgenin içerisinde bulunur, ve doğum sırasında skrotum adı verilen deri kesesi içerisinde dışa doğru inerler, bu işlem sırasında da testisi kaplayan Tunika albuginea adı verilen güçlü ve kalın koruyucu bir zar yapısı oluşur. Testislerin vücudun dışında bulunmasının sebebi ise sperm üretimi için ideal ısının vücut ısısından 2-3°C daha düşük olmasıdır. (Martin, 2022; Mäkelä ve ark., 2018; Eisenberg ve ark., 2023); <https://emrebakircioglu.com/erkek-ureme-sistemi-anatomisi>, Erişim tarihi: 03.02.2024).

Testislerin üç ana görevi vardır: Birincisi; ekzokrin görevi görerek spermatogonial kök hücrelerinin yenilenmesi ve farklılaşarak erkek üreme hücreleri olan spermilerin immotil (hareketsiz) şekilde üretilmesini sağlamaktadır. İkinci olarak, endokrin görevi görerek leydig hücrelerinden androjen hormonu, sertoli hücrelerinden de inhibin ve Müller hücreleri inhibitor hormonları salgılamaktır. Son olarak ise parakrin görevi görerek spermatogenez sürecini regüle etmenin yanı sıra; seminifer tübülleri, interstiyel hücreler ve peritübüler miyoid hücreler arasındaki sinyalleri kontrol etmektir. Testis yapısı; seminifer tübüller ve testis parankim dokusu olarak iki bölümde incelenir. Seminifer tüpler, sertoli hücreleri ve somatik destek hücrelerini içerir, tübüllerin dışında ise doku kan damarları, lenf damarları, sinirler ve leydig hücreleri yer alır (Martin, 2022; Pask,

2016; Eisenberg, 2023). Seminifer tübüllerinin hücresel yapıları şekil 2.1.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.1.4: Şekilde, seminifer tübüllerinin iç yapısı ve spermatogenezin sertoli hücreleri arasında ilerleyişi gösterilmiştir. (Martin,2022)

Seminifer tüplerinde üretilen immotil spermier rete testis'ten geçerek epididimis'te toplanırılar. Epididimis'te ortalama 12 günde olgunlaşarak hareket kabiliyeti kazanan spermier ejakulasyona kadar burada depo edilirler. Ejakülasyon sırasında epididimis'in çevresindeki düz kaslar kasılarak spermier vas deferens kanalına iterler. Deferens kanalında ilerleyen spermier daha sonra seminal veziküle bağılı bulunan ejakulatör kanala girerler. Seminal vezikülde üretilen sıvının içerdığı fruktoz şekeri spermilere hareket için enerji sağlar ve spermierin bu sıvı ile birleşimi meni'yi oluşturur. Daha sonra meni, alkali sıvı salgılayan prostattan geçer. Bu alkali sıvı, meni'yi yoğunlaştırarak spermierin kadın genital sisteminde hayatta kalması için daha dayanıklı hale gelmesini sağlar. Son olarak meni, bülboüretal bezden geçer ve bu bezden salgılanan yoğun sıvı sayesinde ejakulasyona hazır hale gelir (Gurung ve ark., 2023; Scribner ve Tadros, 2021).

2.1.2 Spermatogenez

Spermatogenez, erkeklerde sperm hücrelerinin oluşum ve gelişim sürecini ifade eder. Ergenlik döneminde başlayan bu karmaşık, çok adımlı süreç, testislerin seminifer tübüllerinde gerçekleşir ve spermatozoanın olgunlaşmasını sağlar. Spermatogenez, sürekli olarak seminifer tüplerinin farklı bölgelerinde devam etmekte olan bir işlemdir (Grisworld, 2015).

Spermatogenez sürecinin basamakları üç ana grupta toplanır;

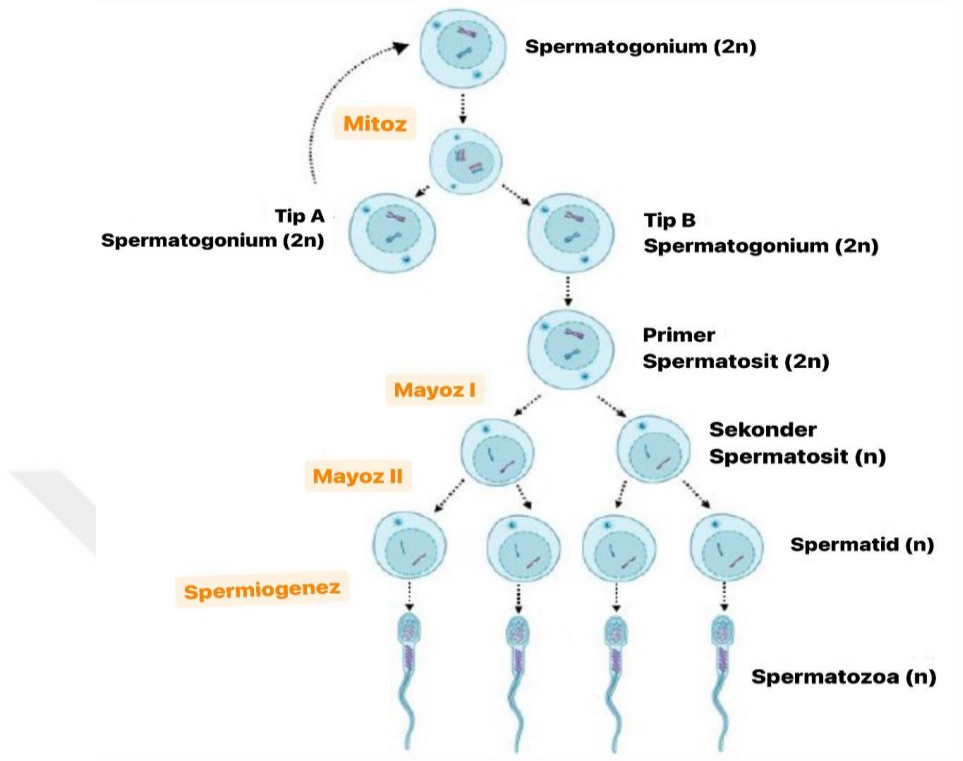
1) Spermatogonium adı verilen kök hücrelerin mitoz bölünmeleri. Spermatogoniumlar, seminifer tübüllerinin bazal (dış) tabakasında bulunur. İki tip spermatogonium vardır; tip A sürekli mitoz bölünme geçirerek spermatogonium hücrelerinin varlığını devam ettirir. Tip B ise yine mitoz bölünme geçirerek iki benzer hücre olan primer spermatositleri oluşturur.

2) Spermatosit hücrelerin mayoz bölünmesi. Mayoz bölünme, 2 aşamadan oluşan (mayoz I, mayoz II) ve hücredeki kromozom sayısını yarıya düşürerek haploid hücreleri oluşturmayı amaçlayan, üreme hücrelerine has bir hücre bölünme çeşitidir. Spermatogonyumlar tarafından üretilen ilk hücreler primer spermatositlerdir ve birinci mayoz bölünme için hazırlanırlar. Mayoz I, primer spermatositlerin iki sekonder

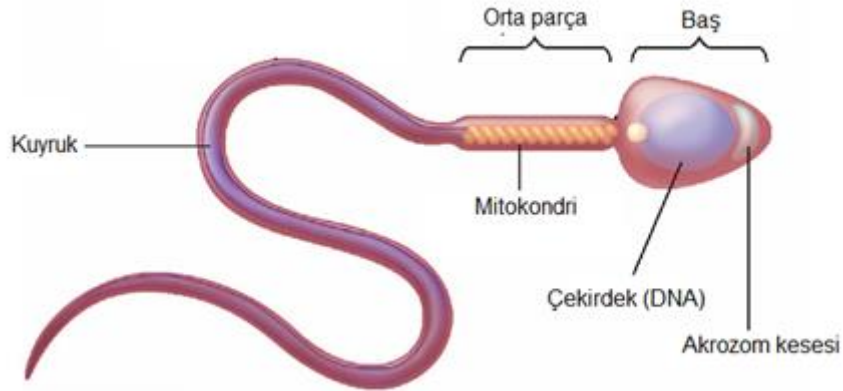
spermatozoid oluşturmasıyla sonuçlanır. Bu bölünme sırasında kromozom sayısı yarıya düşer ve genetik çeşitliliği artırmak için rekombinasyon (aprazlama) meydana gelir. Oluşan sekonder spermatozoidler ise mayoz II ile bölünerek iki spermatid oluştururlar. Kromozom sayısında değişikliğe yol amayan bu bölünme genetik çeşitliliğin artırılması için ikinci bir çaprazlama olayı içerir. Bu aşamada, oluşan hücrelerin (spermatid) boyutu küçülür ve spermatozoanın morfolojik özelliklerini kazanmaya başlarlar (Oatley ve Brinster, 2008; Grisworld, 2015; Martin, 2022).

3) Spermiyogenez adı verilen aşamada, mayoz sonucunda oluşan spermatidler olgun spermatozoaya dnşrlr. Bu süreçte hücre bölünmesi olmaz ama spermatidler geçirdikleri değişimlerle şekilsel ve yapısal olarak olgun spermatozoolara benzemeye başlarlar. Spermiyogenez de kendi içinde; golgi aşaması, şapka/akrozom aşaması, kuyruk oluşumu ve olgunlaşma aşaması olarak dört aşamada incelenir. Golgi fazında, golgi aygıtının hücre içerisinde oluşturmuş olduğu çok sayıda enzim vezikülleri birleşerek akrozomu oluştururlar. Akrozom aşamasında ise, oluşmuş olan akrozom, hücrenin bir yanında kutuplaşırken, Golgi aygıtı da hücre çekirdeğinin diğer kutubuna yerleşir. Daha sonra hücrenin sentriollerinden birisi, spermin kuyruğu olmak için uzar ve mikrotübüler flagella yapısını oluşturur. Son olarak, maturasyon evresinde; spermatid çekirdeği sıkışarak uzamaya başlar ve hücre içerisinde bulunan fazla sitoplazma atılarak sertoli hücreleri tarafından fagositoz edilir. Spermiyogenez sonucunda oluşan hücrelere spermatozoa adı verilir (şekil 2.1.6). Olgun spermatozoa, testislerden epididimise doğru taşınır ve burada daha fazla olgunlaşır ve depolanır. (Grisworld, 2015; Kızılay ve Altay, 2019) Spermatogenez adımları şekil 2.1.5'te gösterilmektedir.

Spermatogenez süreci, hormonal kontrol altında karmaşık bir dizi olayın birleşimiyle gerçekleşir. FSH (Folikül Uyarıcı Hormon) ve LH (Luteinizan Hormon) gibi hipofiz hormonları, testosteron gibi testis hormonları ve lokal faktörler spermatogenez üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu hormonlar, hücre çoğalması, farklılaşması ve olgunlaşması için spermatogenezin her aşamasında gereklidir (Kızılay ve Altay, 2019).



Şekil 2.1.5: Spermatogenez basamakları şekilde gösterilmiştir. (Martin, 2022)



Şekil 2.1.6: Olgun spermatozoa hücreni yapısı şekilde gösterilmiştir.

(<https://www.kaanaydos.com.tr/sperm-mitokondri-hastaliklari-ve-tedavisi.html>; Ocak 2017, Erişim: 06.02.2024)

2.1.3 Sperm Olgunlaşması ve Motilitesi

Oluşum amacı, kadın üreme organlarında hayatta kalarak oositi dölemek olan sperm hücresinin bu amaca ulaşabilmek için epididimis'te hareketlilik kazanması, kadın üreme kanalına girdiğinde ise kapasitasyon geçirmesi ve çok hareketli hale gelmesi gerekmektedir. Spermatogenez sonrasında sperm morfolojik olarak olgunlaşmış olsa da fonksiyonel olarak olgunlaşmamıştır dolayısıyla oositi dölleyebilecek kapasiteye ulaşmamıştır (Freitas ve ark., 2016).

Epididimis, olgunlaşmamış sperm hücrelerinin olgun spermatozoalara dönüşmesi için uygun bir mikroçevre sağlar. Bu süreçte, sperm hücrelerinin membranları ve sitoplazmaları yeniden düzenlenir ve olgunlaşma için gerekli proteinler ve enzimler eklenir. Sperm hücrelerinin hareketliliğinin artması ise kuyruk yapısının olgunlaşması ve mitokondrilerin sayısının artmasıyla sağlanır. Ayrıca bu süreçte, sperm hücrelerinin akrozomu olgunlaşır ve baş, boyun ve kuyruk bölgeleri belirginleşir. Bu, spermatozoanın yumurta hücresine penetrasyonunu ve dölleme sürecini kolaylaştırır. Olgunlaşma sürecinin yanı sıra Epididimis, testislerin ürettiği sperm hücrelerini depolamak için ideal bir ortam sağlar, burada sperm hücreleri çevresel değişikliklere karşı korunarak ejakülasyona hazır hale gelirler. (Freitas ve ark., 2016; Sullivan ve Saez, 2013; Chen ve ark., 2021)

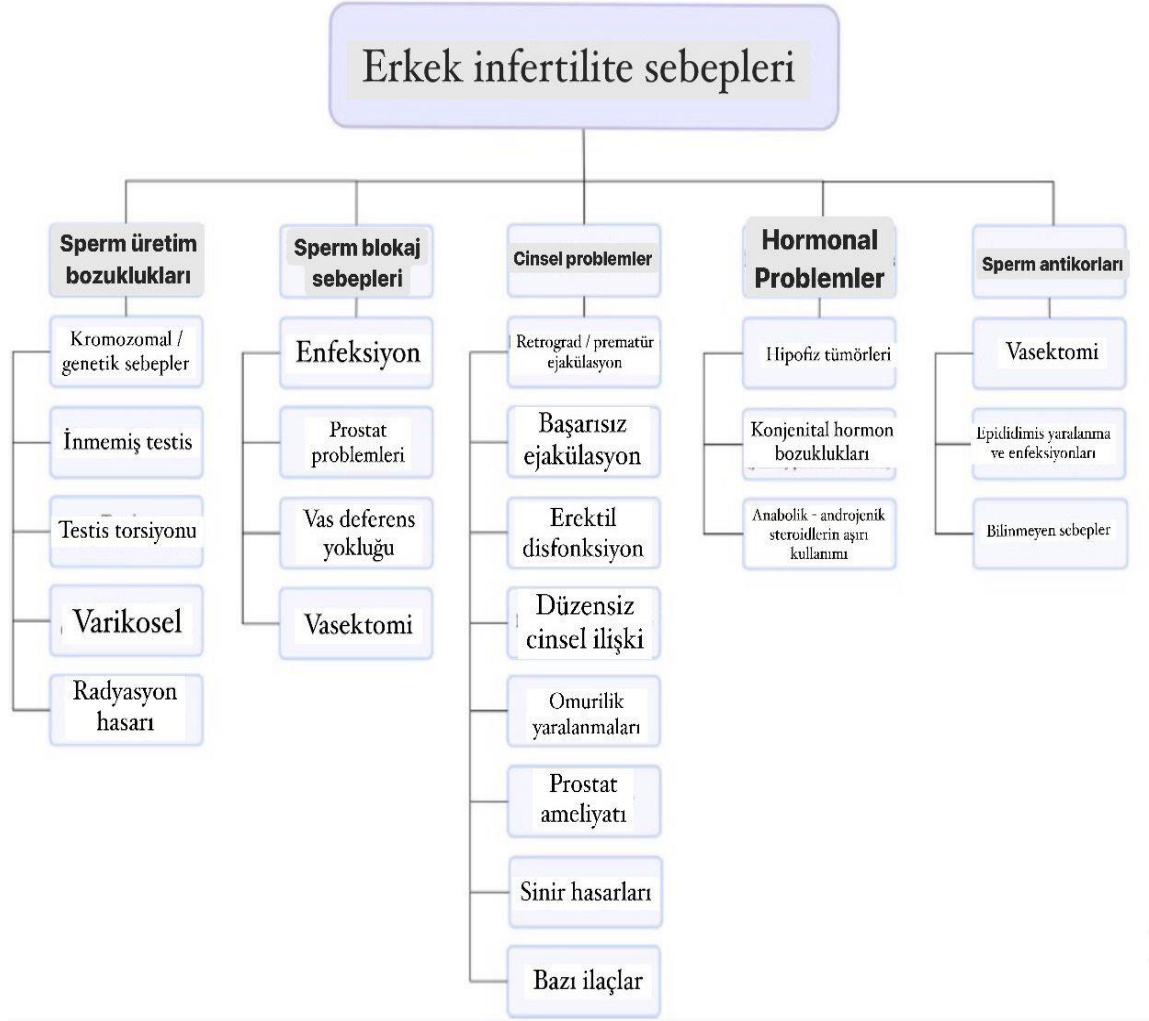
2.2 Erkek İnfertilitesinde Yaygın Bozukluk ve Anomaliler

En az bir yıl korumasız cinsel ilişkiye giren bir çiftin çocuk sahibi olamaması ile tanı alan infertilite, dünya çapında sürekli büyüyen bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan son açıklamalara göre 6 kişiden birisi infertilite sorunu yaşamaktadır. Çocuk sahibi olamayan çiftlerin %50'sinin erkek infertilitesi kaynaklı sorunları oldukları belirtilmiştir (<https://www.who.int/news/item/04-04-2023-1-in-6-people-globally-affected-by-infertility>, Erişim tarihi: 28 Aralık 2023).

Erkek infertilitesi konjenital olarak ortaya çıkabileceği gibi, çevresel faktörler, kötü yaşam kalitesi veya geçirilen hastalıklar ve ilaç kullanımından kaynaklı olarak kazanılmış olabilen multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu faktörler, lokal veya sistemsel etkiler

sağlayarak sperm oluşumunun sayı ve kalitesini etkiler ya da genital organlarda blokaja sebep olarak infertiliteye yol açarlar (Agarwal ve ark., 2020; Martin, 2022). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda keşfedilmiş, bilinen sebeplerin yanı sıra erkeklerde infertilite vakalarının büyük bir kısmının (%30-60) sebebi belli olmayan (idiyopatik) infertiliteye sahip oldukları gözlemlenmiştir (Grande ve Foresta, 2023). Erkek infertilite sebepleri tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1: Erkek infertilitesi sebepleri gruplandırılarak tabloda belirtilmiştir. (Ghanbari, 2020)



Dünya Sağlık Örgütü (WHO), erkek infertilite tanısında konvensiyonel semen analizinin (spermiyogram) ilk adım olarak uygulanmasını tavsiye etmektedir. Spermiyogram testinde, ejakulatta sperm bulunup bulunmaması, bulunan spermelerin sayı ve yapısına göre analizleri yapılmaktadır. (Agarwal ve ark., 2020; Minhas ve ark., 2021) WHO ve Avrupa Üroloji Birliği'nin (EUA) yayınladıkları kılavuzlara göre fertil bireylerde semende bulunması gereken normal sperm konsantrasyonu alt limiti 1ml'de 15 milyondur, sperm hareketliliği en az %40 ve normal morfolojiye sahip sperm oranının ise %4 olması gerekmektedir (Patrick ve ark., 2000; Jungwirth ve ark., 2019). Semen analizi sonucunda alınabilecek ana tanıların tanımları aşağıdaki gibidir (Agarwal ve ark., 2020; Eisenberg ve ark., 2023) ;

Normozoospermi: Sayı, hareketlilik ve morfolojik yapı olarak WHO kılavuzu sınırlarında bulunan, normal kabul edilen semen.

Aspermi: Meniden sıvı gelmemesi yani ejakülasyon olmaması durumudur.

Oligozoospermi: Semende sperm konsantrasyonunun 15 milyondan düşük olduğu durumlardır.

Astenozoospermi: Sperm hareketlilik oranının belirtilenden düşük olması durumudur.

Teratozoospermi: Normal morfolojiye sahip spermelerin %4'ten az oranda bulunmalarına verilen isimdir.

Nekrospermi: Semen içerisindeki spermelerin hepsinin ya da çoğunluğunun ölü olması durumudur.

Azospermi: Semende hiç sperm bulunmamasıdır.

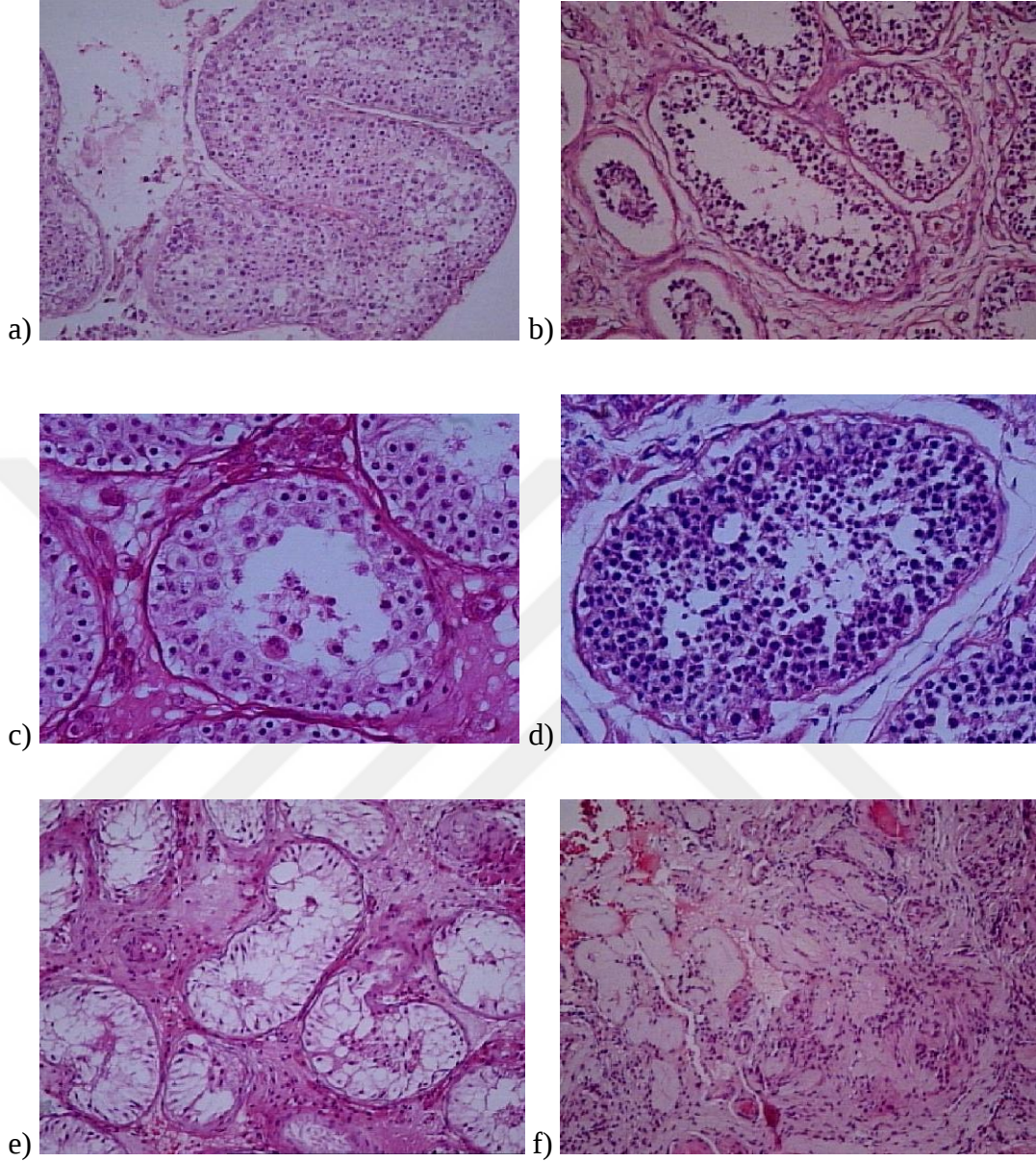
Erkek infertilitesi vakalarının %10-15'lik bölümünde görülen azospermi durumu kendi içerisinde obstruktif (tikanıklığa bağlı olan) ve nonobstruktif (tikanıklığa bağlı olmayan) azospermi olarak ikiye ayrılır. Azospermi sahibi bireylere hem ileri tetkikleri yapılarak infertilite sebebi belirlenmesi hem de çocuk sahibi olmak isteyen bireyler için sperm elde edilmesi amacıyla testiküler sperm ekstrasyonu (TESE) ameliyatları önerilmektedir. Obstruktik azospermi olgularında sperm bulunma oranı daha yüksek olmasına karşı,

nonobstruktif azospermi vakalarında sperm bulunma oranı %40-50 arasındadır (Ünal ve Özer, 2019; Martin, 2022). TESE ameliyatlarında, intrasitoplasmik enjeksiyon için sperm ekstraksiyonunun yanı sıra testis dokusundan alınan örnekler patolojik ve histolojik olarak da incelenmektedir. Histolojik olarak örnekler; seminifer tübülüsün yapısı ve hücre elemanları, interstisyum, dejeneratif değişiklikler ve hücre yapısı anomalileri açısından incelenmektedirler. Patolojik olarak ise spermatogenezin işleyişi ve testiküler değişikliğe eşlik eden karyotipik anomaliler incelenmektedir (Orhan, 2012). Patolojik tanıların görsel örnekleri şekil 2.2’de gösterilmektedir.

Yapılan histopatolojik incelemeler sonrasında örnekler, testis hasarı ve spermatogenez seviyeleri göz önünde bulundurularak Johnsen skorlama sistemine göre 1 ile 10 arasında bir testis biyopsi skoru alırlar. Öncelikle biyopside gözlenen her seminifer tübülüs için ayrı ayrı skor verilir sonra bu skorların toplamı biyopside izlenen seminifer tübülüs sayısına bölünerek ortalama skor hesaplanır (Orhan, 2012; Thanh ve ark., 2020). Patohistolojik olarak yapılan incelemeler sonucu verilen Johnsen skorlarının anlamları tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2: Johnsen Skorlama Sistemine göre seminifer tüplerinin sınıflandırılması. (Orhan, 2012; Thanh ve ark., 2020)

SKOR	AÇIKLAMA
10	Germinal epitel çok sıralı, çok sayıda spermatozoa var
9	Germinal epitel disorganize ve lümene doğru yığılma, spermatozoa var
8	Germinal epitel çok sıralı ancak lümende 10’dan az spermatozoa var
7	Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid var
6	Spermatozoa yok, spermatid 10’dan az
5	Spermatozoa yok, spermatid yok, spermatosit var
4	Spermatozoa yok, spermatid yok, spermatosit 5’den az
3	Germ hücre olarak sadece spermatogonia var
2	Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücresi var
1	Seminifer tubulus içinde hiç hücre yok



Şekil 2.2: Şekilde testis biyopsi örneklerinin patolojik tanılarına örnek görseller verilmiştir. a) Normal bir testis örneği gösterilmiştir. b) Hipospermatogenez / Germ hücre hipoplazisi göstermektedir. Spermatogenez ve maturasyon süreci normaldir fakat sperm üretimi azdır. c) Spermatogenik maturasyon arresti; şekildeki örnekte spermatogenez primer spermatosit evresinde durmuştur. d) Spermiyogenik arrest; şekilde çok sayıda spermatid gözlemlenirken spermatozoa bulunmamaktadır. e) Germ hücre aplazisi (sertoli cell only, SCO) örneği gösterilmiştir. f) Tübüler skleroz (seminifer tüplerin hasarlı olması) durumunda hyalinize bantlar halini almış seminifer tübülüsler gösterilmiştir. Bu durumun inmemiş testis, karyotipik anomali, akkiz gonadotropin eksikliği gibi durumlardan kaynaklı olgularda görüldüğü belirtilmiştir. (Orhan, 2012)

2.3 Azospermik Erkek İnfertilitesinde Genetik Faktörler

Erkek infertilitesinde genetik faktörler, fetal ve çocukluk gelişiminden yetişkinlerde organ fonksiyonlarına kadar geniş bir sıklıkta etkili rol oynamaktadır. Güncel olarak “GeneCards” veritabanında tanımlanmış olan 4,400’den fazla genin erkek üreme sisteminde, bunların yanı sıra 3,200’den fazla genin de erkek infertilitesinde etkin rol oynadıkları bilinmektedir (Eisenberg ve ark., 2023).

İnfertilite türleri arasında genetik anomali taşıyıcısı olma riski en yüksek grubun azospermik infertil bireyler oldukları gözlemlenmiştir. Azospermide etkili olan genetik faktörler; kromozom anomalileri, Y kromozom mikrolelesyonları, monogenik mutasyonlar, epigenetik faktörler olarak dört ana başlık altında incelenebilir (Agarwal ve ark., 2020; Neto ve ark., 2016, Sudhakar ve ark., 2021).

2.3.1 Kromozomal Anomaliler

Çoğunlukla mayoz bölünme sürecinde kromozom sinapsisi veya kromozom ayrılmalarında yaşanan aksaklıklarla ortaya çıkan kromozomal anomaliler, azospermik infertilite faktörlerinin %15’ini oluşturmaktadır (Martin, 2022).

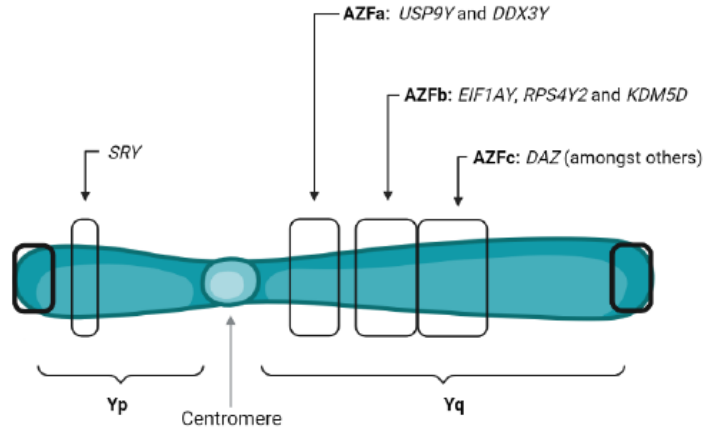
Erkek infertilitesine sebep olan en yaygın sayısal kromozomal bozukluk, 1/600 erkekte bulunan Klinefelter sendromudur (47, XXY). Mayoz I sırasında kromozomların ayrılamaması ile ortaya çıkan bu durumun %60 oranla babadan gelen X kromozomu kaynaklı olduğu belirtilmektedir (Martin, 2022, Neto ve ark., 2016). Daha nadir bulunan bir diğer sayısal anomali ise mayoz II’de Y kromozomunun kromatidlerinin ayrılmaması sonucunda 47,XYX genotipine yol açan Jacobs sendromudur. Bu sendroma sahip bireyler genellikle azospermik veya oligozoospermik olmalarına rağmen fertil de olabilmektedirler. (Sudhakar ve ark., 2021; Neto ve ark., 2016)

İnfertilite ile bağlantılı yapısal kromozomal anomalilerin başında Robertsonian translokasyonları gelmektedir. Akrosentrik kromozomların uzun kollarının birbirleri ile kaynaşması sonucunda oluşan bu translokasyonları taşıyan bireylerde spermatogenezde aksaklıklar ve sperm anöplidileri görülmektedir (Neto ve ark., 2016). Bir diğer yapısal kromozomal anomali de 46,XX erkek bireylerde görülmektedir. Bu vakalar mayoz I

sırasında Y kromozomu üzerindeki *SRY* geninin crossing-over aracılığı ile X kromozomu üzerine geçmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Fenotip olarak erkek gelişimine sahip olan bu bireyler Y kromozomu uzun kolunda bulunan *AZF* bölgelerine sahip olmadıklarından dolayı SCO sendromu olarak infertil olurlar. (Kuroda ve ark., 2020; Adrião ve ark., 2020)

2.3.2 Y Kromozom Mikrodelesyonları

Y kromozomu üzerinde bulunan gen bölgelerinin büyük bir çoğunluğu erkek cinsiyet özellikleri ve spermatogenez ile ilişkili bölgelerdir. Kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan *AZF* a, b ve c bölgelerinin spermatogenezde önemli rol oynadıkları ve bu bölgelerde oluşan mikrodelesyon mutasyonlarının infertilitede etkin rol oynadıkları bilinmektedir. *AZF*a ve *AZF*b bölgelerindeki tam delesyonlarının sırasıyla SCO sendromu ve matürasyon arrestine yol açtıkları bilinirken *AZF*c bölgesi delesyonları spermatogenik başarısızlığa sebep olmaktadır. (Kuroda ve ark., 2020; Martin 2022; Cerván-Martín; 2020) Y kromozomu *AZF* bölgeleri şekil 2.3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.3.1: Yukarıdaki şekilde Y kromozomu azospermik faktör (*AZF*) gen bölgeleri şematize edilmiş ve bu bölgelerde erkek infertilitesinde rol oynayan başlıca genler belirtilmiştir. Aynı zamanda erkek üreme sistemi oluşumundan sorumlu *SRY* geni de gösterilmiştir. (Martin, 2022)

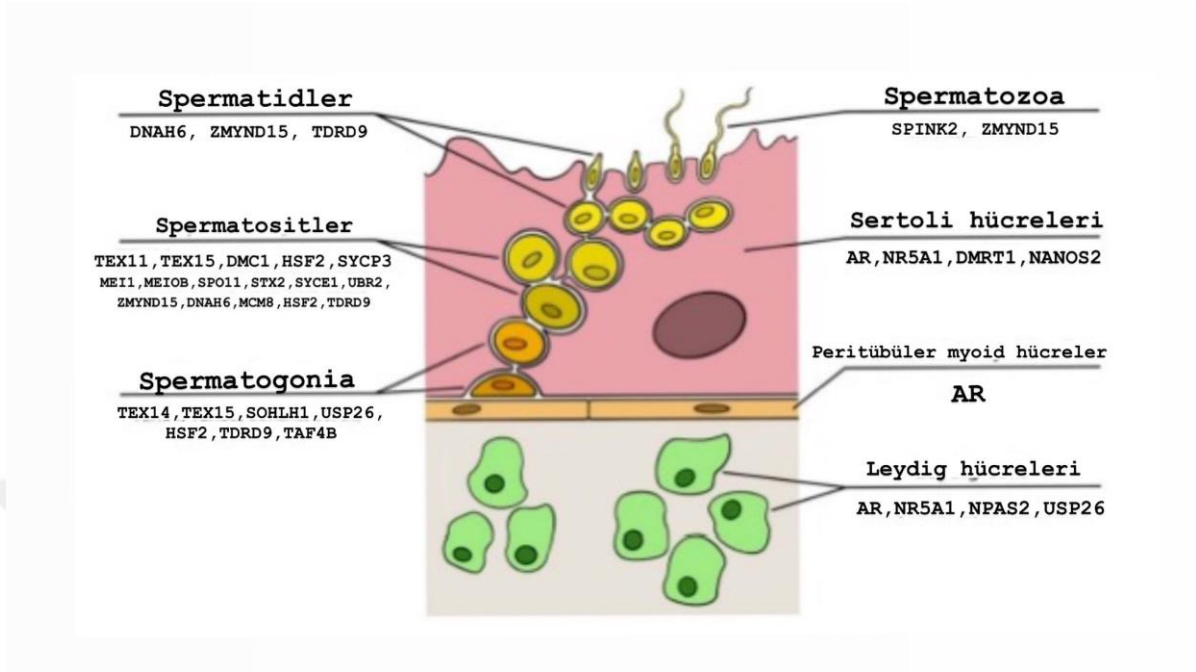
2.3.3 Monogenik Mutasyonlar

Son yıllarda gelişen yeni nesil dizileme (NGS) yöntemleri sayesinde otozomal bölgelerde bulunarak erkek üreme sistemi gelişimi ve spermatogeneze katkıda bulunan birçok gen açığa çıkmıştır. Fakat yeterli validasyon çalışmaları bulunmamasından dolayı bu genlerin çoğunun etkin rolleri ve biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacakları konuları henüz kesin olarak açığa çıkarılamamışlardır. (Cerván-Martín; 2020)

Deferens kanalında problemlere yol açarak obstruktif azospermiye sebep olduğu bilinen ve bir otozomal kromozom olan 7q31.2 bölgesinde yer alan; kistik fibroz transmembran iletkenlik regülatörü (*CFTR*) geni bu gruba örnek olarak verilebilir. *CFTR* geni üzerinde 1950'den fazla mutasyon tanımlanmış olup bu mutasyonların moleküler yollarındaki farklılıklardan dolayı *CFTR* geni mutasyonlarının fenotipleri geniş bir spektruma sahiptirler. (Neto ve ark., 2016)

Monogenik mutasyonlara örnek olabilecek bir hastalık ise X kromozomuna bağlı olup erkeklerde, kadınlara oranla 5 kat daha fazla görülen Kallman sendromudur (KS). KS, Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) nöronlarının gelişiminden sorumlu iki gen ile (Kallman sendromu1(*KAL1*) ve Fibroblast Growth Faktör Reseptör 1(*FGFR1*), ilişkilendirilmektedir. Bu genlerde oluşan mutasyonlar sonucunda ortaya çıkan KS'de hipogonadizm, ergenlikte gecikme ve infertilite görülmektedir. (Neto ve ark., 2016)

Monogenik mutasyonlar endokrin ve üreme sistemini etkileyip kronik ve patolojik hastalıklar yoluyla infertiliteye yol açabilecekleri gibi bazı gen mutasyonları da spermatogenezi direk olarak etkilemektedirler (Cerván-Martín ve ark., 2020). Yapılan çalışmalarda spermatogenezi etkileyerek nonobstruktif azospermiye yol açtığı saptanan bazı genler şekil 2.3.2'de gösterilmiştir.

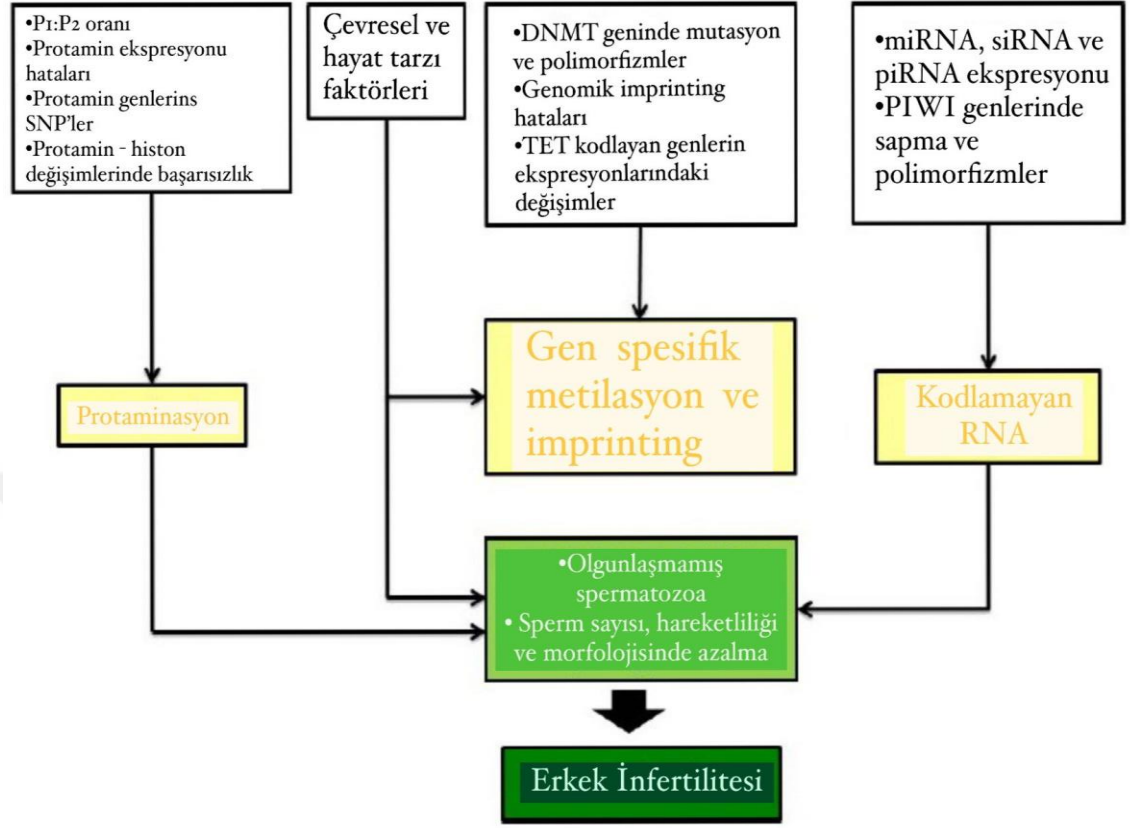


Şekil 2.3.2: Yukarıdaki şekilde spermatogenez basamakları ve bu basamaklarda rol oynadığı saptanmış bazı genler şematize edilmiştir. Yukarıda bahsedilen genlerin mutasyonlarının nonobstruktif azospermiye yol açtığı belirtilmiştir. (Cerván-Martín ve ark., 2020)

2.3.4 Epigenetik Faktörler

Epigenetik, DNA dizisinde değişiklik yapmadan genlerin ekspresyon seviyelerini değiştiren, geri dönüştürülebilir yollardan oluşan bir ekspresyon regülasyon sistemidir. Epigenetik mekanizmalar; DNA metilasyonu, post-translasyonel histon modifikasyonu, kromatin yeniden düzenlemesi ve kodlamayan RNA regülasyonudur. (Neto ve ark., 2016; Gunes ve Esteves; 2020)

Epigenetik faktörler, hem sperm üretiminde hem de fonksiyonlarının ve dölleme potansiyellerinin kazanılmasında önemli rol oynar. Epigenetik faktörler ve erkek infertilitesi ile bağlantıları şekil 2.3.3'te verilmiştir. (Gunes ve Esteves. 2020)



Şekil 2.3.3: Epigenetik faktörlerin spermatogenez ve erkek infertilitesi üzerindeki etkisi gösterilmiştir. (Gunes ve Esteves. 2020)

DNA metilasyonu, DNA'ya metil grubu (-CH₃) bağlanarak gen susturulması yöntemidir ve kalıtsal olarak aktarılabilen bir modifikasyondur. Bu işlem DNA metiltransferaz (DNMT) protein ailesi tarafından yürütülmektedir. DNMT1, DNA replikasyonu sırasında yürütülen DNA metilasyonunda rol oynamaktadır ve spermatogenez sırasında DNMT'in işleyişinde aksaklıkların yaşanması özellikle paternal olarak susturulan (imprinted) genlerde metilasyon kaybına yol açar. (Gunes ve Esteves. 2020) Yapılan bazı çalışmalarda, özellikle imprinted Mezoderm Spesifik Transkript (*MEST*) ve bir RNA geni olan *H19* genlerinin ve non-imprinted Metilen Tetrehidrofolate Redüktaz (*MTHFR*) geninin infertilite ile bağlantılı oldukları görülmüştür (Rotondo ve ark., 2021).

Kromatin yeniden düzenleme işlemi, yüksek miktardaki DNA'nın küçük bir hücre olan spermatozoa içerisine paketlenmesi açısından önemli bir işlemdir. Spermatogenez

sırasında, histonlar ile spermatozoa'ya özgü, küçük proteinler olan protaminlerin yer değiştirmeleri sperm DNA'sının çekirdek içerisinde daha az yer kaplamasını sağlar. Dolayısıyla, Kromatin yeniden düzenleme işleminde yaşanabilecek aksaklıklar spermatozoa'da morfolojik bozukluklara yol açmaktadır. (Gunes ve Esteves. 2020)

Histon modifikasyonları, gen regülatörlerinin DNA'ya bağlanmasını etkileyerek gen ekspresyonlarının artması veya azalmasını sağlar. H3 ve H4 histonlarının metilasyonu ve H2B histonunun ubiquitinasyonu gibi spesifik modifikasyonlar gen ekspresyonunun artmasına yol açar. Tam aksine, H2A histonunun ubiquitinasyonu ve H3K9 ve H3K27'nin metilasyonu da genlerin susturulmasını sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda, bu histon modifikasyonları fertil ve infertil bireylerde karşılaştırıldıklarında önemli farklılıklar bulunduğu gözlemlenmiştir. (Gunes ve Esteves. 2020)

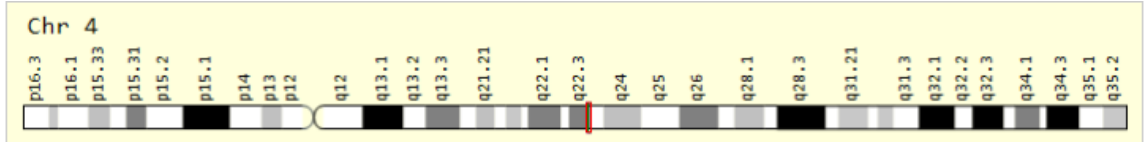
Kodlamayan RNA'lar (ncRNA), uzun ncRNA ve kısa ncRNA olarak ikiye ayrılır. Kısa ncRNA'lar da kendi içinde miRNA, siRNA and piRNA olmak üzere üçe ayrılır. Gen ekspresyonunun regülasyonunda önemli rol oynayan kısa ncRNA'lardan piRNA'lar, PIWI proteinler ile bağlantı kurarak spermatogenezin regülasyonuna katılırlar. (Neto ve ark., 2016; Gunes ve Esteves; 2020)

2.4 Erkek İnfertilitesinde Aday Genler

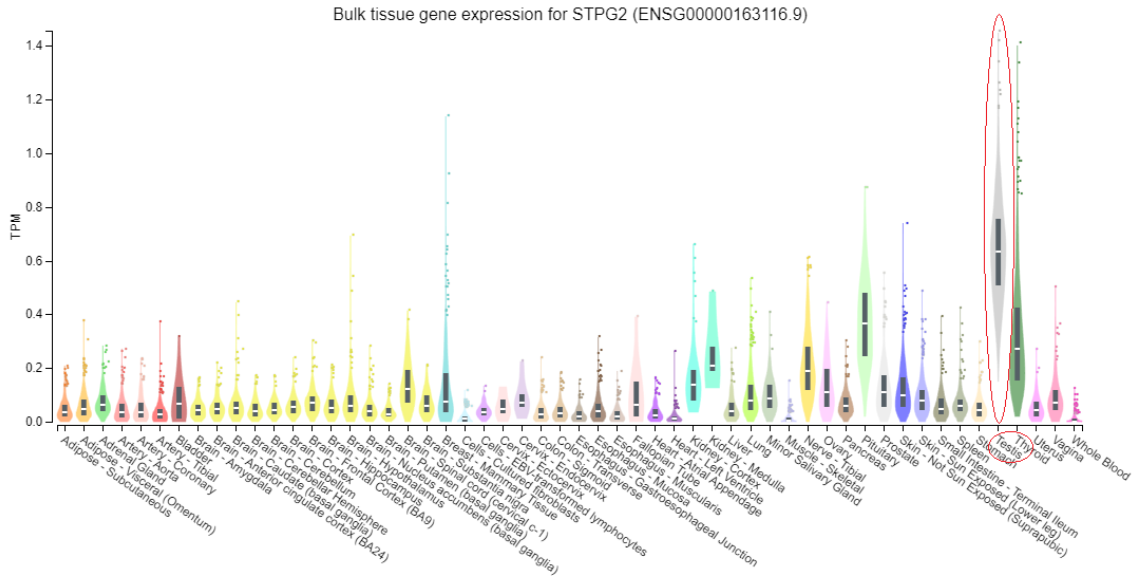
2.4.1 *STPG2*

Sperm tail PG-rich repeat containing 2 (*STPG2*) geni 4. Kromozom'un q kolunda, 4q22.3-q23 lokasyonunda bulunan 16 ekzonlu bir gendir (şekil 2.4.1 (A)). "*C4orf37*" olarak da bilinen *STPG2* geninin protein yapısı ve fonksiyonu tam olarak bilinmese de "Protein Atlas" platformuna göre transkript düzeyinde protein kodladığı kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra *STPG2* geni en yüksek ekspresyon seviyesini testislerde göstermektedir (Yakut ve ark., 2012). Genotip-Doku Ekspresyonu (GTEx) Konsorsiyum Projesi tarafından açıklanan verilere göre, gen ekspresyonu testis dokusuna ek olarak endokrin bezleri ve beyinde de ekspresyon göstermektedir (şekil 2.4.1 (B)) (GTEx Konsorsiyum, 2017).

(A)



(B)



Şekil 2.4.1: (A) *STPG2* geninin 4 numaralı kromozomdaki yeri gösterilmiştir. (B) *STPG2* geninin insan dokularındaki ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. Testis dokusu ekspresyon seviyesi kırmızı daire içerisine alınmıştır. Testis doku ekspresyonu ortalama değeri 0.6, kan ekspresyonu ortalama değeri ise 0.00 olarak verilmiştir.

Önceki yıllarda yapılan bir çalışmada Floating Harbor Sendromlu (FHS) hastalarda *STPG2* geninin hipermetilasyon seviyesi %24, kontrol grubunun hipermetilasyon seviyesi %3 olarak gözlemlenmiştir (Hood ve ark., 2016). FHS klinik bulguları arasında; kısa boy, iskelet gelişim anomalileri, konuşma ve duyma bozukluklarının yanı sıra erkeklerde hipospadiyas ve inmemiş testisler gibi genital bozukluklar da görülmektedir (Nowaczyk ve ark., 2012).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *STPG2* geninin gamet oluşum ve fonksiyonlarında rol oynadığı ve bu genden üretilen sperm-tail PG-rich repeat containing 2 proteininin de spermde bulunduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda aday gen olarak belirlenmesine rağmen *STPG2*'nin özel olarak çalışılmamış olmasının sebebinin genin moleküler

karakterizasyonunun son yıllarda belirlenmesi olduğu belirtilmiştir (Cheng ve DeGiorgio, 2020). Bir yeni nesil dizileme (NGS) yöntemi olan tam ekzon dizileme (WES) ile Asya’da yapılan bir çalışmada *STPG2* genini de içeren, mikrotübül yapılarında rol oynadığı düşünülen bir grup genin SNP mutasyonlarına bakılmış ve *STPG2* geninde infertil bireylerin mutasyon oranlarının fertil bireylere oranla %40 daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Mutasyon oranlarında görülen bu farklılık, *STPG2* geninin testis gelişimi ve spermatogenezde etkin bir rol oynadığının ve *STPG2* proteininin yokluğunun spermatogenezi bozabileceğinin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Fakat araştırmacılar, aynı SNP değişimlerinin fertil bireylerde de görülmesinden dolayı, *STPG2*’nin infertilite için belirleyici bir biyobelirteç olarak kullanılamayacağını ileri sürmüşlerdir (Chan ve ark., 2023).

2.4.2 RNF8

RING Finger 8 (*RNF8*), 6 numaralı kromozomun p21.2 bandında bulunan (şekil 2.4.2.1), 8 ekzon bölgesine sahip bir gendir. Bu genin kodladığı RNF8 proteini; N terminali, FHA alanı ve bir C-terminal RING alanına sahip, 485 amino asitten oluşan bir nükleer polipeptittir. Diğer RING domaini içeren proteinler gibi RNF8 de E3 ubiquitin kinaz aktivitesi göstermektedir (Lu ve ark., 2010). “Genotip – Doku Ekspresyonu” veritabanına göre RNF8 geni tüm dokularda ekspresyon göstermesine rağmen en yüksek gen ekspresyon seviyesi testis dokusunda görülmektedir. (GTEx Konsorsiyum, 2017).

Geçmişte yapılan çalışmalarda RNF8 proteininin histon ubiquitinasyonu yaparak DNA hasarına yanıt olarak DNA’nın histon proteinleri ile olan bağlantılarının çözülmesinde ve spermatogenezde rol oynadığı görülmüştür (şekil 2.4.2.2). DNA hasarının onarımı sırasında, DNA hasarı kontrol noktası protein 1 aracısı (MDC1) proteinine bağlanarak aynı yönde çalışmalar da spermatogenezde mayoz bölünme sırasında RNF8 aktivasyonu sağlarken MDC1 süreci durdurmaktadır (Sin ve ark., 2012). RNF8 proteini histon uzaklaştırma sürecinde H2A, H2AX ve H2B histonları ile bağlanmaktadır (Xiong ve ark., 2022).

Fare modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda spermatogenezin pakiten evresinde ubikitinlenmiş H2AX histonunun (ubH2AX) özellikle XY cismi üzerinde yoğunlaşarak mayozda seks kromozom inaktivasyonunu (MSCI) sağladığı görülmüştür. RNF8 geni susturulmuş farelerde ise ubH2AX'ın XY cismi üzerindeki yoğunluğunun azalması, RNF8'in bu süreçte rol oynadığını göstermektedir (Xiong ve ark., 2022). Yapılan gen susturma çalışmalarında, *RNF8* geninin cinsiyet kromozomlarının aktivasyonu ve konfigürasyonunda önemli rol oynadığı ve *RNF8* geni susturulmuş farelerde sperm kalitesinin düştüğü tespit edilmiştir (Sin ve ark., 2012). Bunun yanı sıra *RNF8* geni susturulmuş fareler, yabanıl tip farelerle karşılaştırıldıklarında yavrulama oranlarının ve testis boyutlarının büyük oranda değişiklik gösterdikleri saptanmıştır. Fakat *RNF8* geni susturulmuş farelerin tamamen steril olmamaları *RNF8*'in ubikitinasyonda rol oynuyor olmasına rağmen bir gereklilik olmadığını göstermiştir (Guo ve ark., 2018; Abe ve ark., 2021).

2.4.3 *GTSF1*

Gametocyte Specific Factor 1 (*GTSF1*) geni, 12 numaralı kromozomun q13.13 bandında yer alan 10 ekzonlu bir gendir. GTEx veri tabanına göre en fazla ekspresyonu testis dokuda göstermektedir (şekil 2.4.3). Testislerde ekspresyon seviyesinin yüksekliği ve kadınlarda yumurtalıklarda da ekspresyonu olduğu bilinmesine rağmen *GTSF1* geni üzerine yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. Dolayısıyla genin yolakları ve bağlantıları henüz bilinmemektedir. Dokuz transkripti bulunan bu *GTSF1* geninin, hücre farklılaşması ve spermatogenezde rol oynadığı düşünülmektedir (Alliance of Genome Resources Konsorsiyum, 2022).

argonaute proteinler olan PIWI proteinleri aktive ederek endoribonükleaz'a dönüşümelerini sağladığı gösterilmiştir. Bu özelliği sayesinde GTSF1, argonaute proteinlerin katalitik aktivitesinde yardımcı protein rolü oynayan ilk protein olarak belirtilmiştir (Arif ve ark., 2022).

Hem erkeklerde testislerde hem de kadınlarda yumurtalıklarda ekspresyon gösteren *GTSF1* geninin ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında yetişkinlerde, testislerde gen ekspresyonunun daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kadınlarda, oosit oluşumu sürecinde doğumdan önce yer alan mayoz I sırasında ekspresyon gösteren *GTSF1*'in yetişkin erkeklerde ise spermatogenez sırasında ekspresyon gösterdiği, infertil bireylerde ise fertil bireylere kıyasla gen ekspresyon seviyesinin daha düşük olduğu saptanmıştır (Rockenbach ve ark., 2023).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Hasta Seçimi ve Örneklerin Toplanması

Tez projesi kapsamında araştırmaya başlamadan önce Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı (Karar No: KAEK-36/16.02.2022); hasta veya kontrol grubu içerisinde araştırmaya katılan tüm bireylerden “Asgari Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” (Ek 1) imzalatılarak onam alınmıştır.

Bu araştırmada Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Üroloji Anabilim dalında idiyopatik infertilite tanısı konmuş fertil yaş aralığında (18-50) 31 erkek birey hasta grubuna seçilmiştir. Y kromozomu mikrodelesyonu, Klinefelter Sendromu, *CFTR* geni mutasyonu veya kabakulak ya da testis kanseri geçmişi olması gibi infertilite sebebi belli olan 9 birey ise hasta kriterlerine uymamaları sebebiyle doku örneği kontrol grubu olarak seçilmişlerdir. Fertil kontrol grubu için ise Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Kan Alım Merkezi'ne gelen 18-50 yaş aralığındaki çocuklu 32 erkek bireyden kan örneği alınmıştır.

Araştırmaya katılan hastaların testis doku örnekleri; Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Üroloji Anabilim dalı tarafından yapılan TESE operasyonları sırasında cerrahi ekip tarafından alınmıştır. RNA degradasyonunu engellemek amacıyla buz kabında liziz solüsyonu içerisine alınan yaklaşık 30mg testis doku örnekleri laboratuvara taşınarak vakit kaybetmeden total RNA izolasyonları yapılmıştır. 30mg'ın üzerinde alınan dokulardan artan örnekler -80 °C 'de, artan kan örnekleri ise +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2 Total RNA İzolasyonu

Dokudan ve kandan total RNA ekstraksiyonu için “GeneJET RNA Purification Kiti (#K0731)” protokol doğrultusunda kullanılmıştır.

3.2.1 Dokudan Total RNA İzolasyonu

1. Dokular, içerisine önceden β -merkaptoetanol (1ml Liziz Buffer + 20 μ l β -merkaptoetanol) eklenmiş olan 300 μ l liziz solüsyonuna alınmıştır. Dokular

solüsyon içerisinde homojen hale gelene kadar sonikatör yardımı ile 20-40 saniye parçalandıktan sonra vortexlenmiştir.

2. Üzerine 600 µl Tris-EDTA (TE) Buffer + Proteinaz K solüsyonu (10µl + 590µl TE Buffer) eklenmiş ve pipetaj yaparak karıştırıldıktan sonra 15-25°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir.
3. Sonrasında 12000rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek örneklerin çöktürülmesi sağlanmış ve süpernatant temiz bir eppendorf tüpe aktarılmıştır.
4. Temiz tüpe alınan süpernatant üzerine 450µl %96 etanol eklenmiş ve pipetaj yaparak karıştırılmıştır.
5. Kit içerisinde mevcut bulunan filtreli kolonlar, toplama tüpleri içerisinde yerleştirilmiştir. Örnekten 700µl bu kolona aktarıldıktan sonra 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan sıvı dökülmüş ve kolonda sıvı kalmayana kadar santrifüj tekrar edilmiştir.
6. Sonrasında kolon, temiz tüpe alınmış ve üzerine 700µl “Wash Buffer 1” solüsyonu eklenip 12000rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiş ve yine toplama tüpünde biriken sıvı dökülmüştür.
7. Kolona 600µl “Wash Buffer 2” eklenmiş ve 12000 rpm’de tekrar 1 dakika santrifüj edilmiş ve kolonda biriken sıvı dökülmüştür.
8. Kolon üzerine bir kez daha, 250µl “Wash Buffer 2” eklenmiştir ve bu kez 1200 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Çıkan sıvı döküldükten sonra filtreli kolonlar 1.5ml eppendorf tüplerine aktararak üzerlerine 100µl Nuclease-free su eklenerek 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Eppendorf tüplerine toplanan RNA örnekleri cDNA elde edilene kadar -20°C buzdolabında, sonrasında artan RNA örnekleri ise -80°C’de saklanmıştır.

3.2.2 Kandan Total RNA İzolasyonu

1. 1.5ml’lik eppendorf tüplerine 0.5ml (500µl) kan örneği aktarılmış, bu örnekler soğutmalı santrifüj cihazında +4°C’de, 600rpm’de 5 dakika çevrilmiştir.
2. Santrifüj sonrasında üste çıkan sarı plazma sıvısı pipet ile çekilerek atılmıştır.

3. Tüpte kalan pellet üzerine 600µl içerisinde önceden β-merkaptöetanol (1ml Liziz Buffer + 20µl β-merkaptöetanol) eklenmiş olan liziz solüsyonu konulup vortexlenmiştir.
4. Örnek üzerine 450µl %96 etanol eklenmiş ve pipetaj yaparak karıştırılmıştır.
5. Kit içerisinde mevcut bulunan filtreli kolonlar, toplama tüpleri içerisinde yerleştirilmiştir. Örnekten 700µl bu kolona aktarıldıktan sonra 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan sıvı dökülmüş ve kolonda sıvı kalmayana kadar santrifüj tekrar edilmiştir.
6. Sonrasında kolon, temiz tüpe alınmış ve üzerine 700µl “Wash Buffer 1” solüsyonu eklenip 12000rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiş ve yine toplama tüpünde biriken sıvı dökülmüştür.
7. Kolona 600µl “Wash Buffer 2” eklenmiş ve 12000 rpm’de tekrar 1 dakika santrifüj edilmiş ve kolonda biriken sıvı dökülmüştür.
8. Kolon üzerine bir kez daha, 250µl “Wash Buffer 2” eklenmiştir ve bu kez 1200 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Çıkan sıvı döküldükten sonra filtreli kolonlar 1.5ml’lik eppendorf tüplerine aktararak üzerlerine 50µl Nuclease-free su eklenerek 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Eppendorf tüplerine toplanan RNA örnekleri cDNA elde edilene kadar -20°C buzdolabında, sonrasında artan RNA örnekleri ise -80°C’de saklanmıştır.

3.3 Total RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü

Doku ve kan örneklerinden elde edilen total RNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümleri Quawell/Q9000B spektrofotometre cihazı ile belirlenmiştir. Ölçüm için 1.5µl RNA örneği spektrofotometre cihazına yüklenmiştir. Örneklerin 260/230 nm dalga boylarında elde edilen ölçümlerinin oranları ile RNA’nın saflığı ve miktarı ng/ µl cinsinden belirlenmiştir.

3.4 Revers Transkriptaz enzimi ile cDNA sentezi

Çalışma dahilinde doku ve kan örneklerinden elde edilen total RNA’lar Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (4368814) ile kit

protokolü takip edilerek, Blue-Ray Biotech's TurboCycler 2 PCR cihazı kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. Reaksiyonların sağlıklı bir şekilde, gerçekleşmesi adına örnekler ve kit içeriğindeki malzemeler buz üzerinde çözdürülmüş ve reaksiyon master mix'i buz üzerinde hazırlanmıştır. Revers transkripsiyon sonrasında elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de buzdolabında saklanmıştır.

cDNA eldesi için kullanılan Revers transkripsiyon kit malzemeleri ve kullanım miktarları tablo 3.1'de, total RNA'dan cDNA eldesi reaksiyonunun adımları ise tablo 3.2'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1: Revers transkripsiyon kit malzemeleri ve 1 reaksiyon için kullanım miktarları.

Malzeme içeriği	(1x) Kullanım Miktarı
10x RT Tamponu	2µl
25x dNTP Mix	0.8µl
RT Random Primerler	2µl
MultiScribe™ Revers Transkriptaz	1µl
Nükleaz içermeyen su	4.2µl
Master Mix Total Hacim	10µl
Total RNA Örneği	10µl
Total Reaksiyon Hacmi	20µl

Tablo 3.2: cDNA sentez reaksiyonu adımları.

	Primerin Bağlanması	cDNA sentezi	İnaktivasyon	Soğuma
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Süre (dk)	10 dk	120 dk	5 dk	∞

3.5 cDNA Örneklerinin Spetrofotometrik Ölçümü

-20°C’de saklanmakta olan cDNA örnekleri Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) öncesinde çözündürülmüş ve her örnekten 2µl Thermo Fisher NanoDrop™ 1000 Spektrofotometre cihazına yüklenerek yoğunluk ve saflık ölçümleri yapılmıştır. Saflık derecesi ölçümü için 260/280nm dalga boylarının oranları dikkate alınmıştır. Ölçülen örnekler qRT-PCR’a hazırlık olarak reaksiyon öncesinde 100ng/µl olacak şekilde sulandırılmıştır.

3.6 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeriz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

qRT-PCR yöntemi, floresan probalar içeren, PCR reaksiyonunun başlangıcından sonuna kadar bu floresan sinyalleri kullanarak reaksiyon içerisindeki DNA amplifikasyonunu gerçek zamanlı takip eden bir sistemdir. Bu yöntem, tez projesi kapsamında alınan örneklerde araştırma konusu olan *STPG2*, *RNF8* ve *GTSF1* genlerinin ekspresyon seviyelerini ölçmek için kullanılmıştır. Deneyler, Bio-Rad CFX96 Real Time PCR cihazı ve Ampliqon RealQ Plus 2x Master Mix Green with High ROX™ kiti kullanılarak, kit protokolüne uygun olarak yürütülmüştür. Reaksiyonların sağlıklı ve düzgün çalışması açısından kit solüsyonları buz üzerinde çözündürülmüş ve master mix’ler buz üzerinde hazırlanmış ve 96 kuyucuklu platelere dağıtılmıştır. Kit içerikleri, kullanım miktarları tablo 3.3’te, PCR reaksiyonu adımları ise tablo 3.4’te gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Ampliqon RealQ Plus 2x Master Mix Green with High ROX™ kit reaksiyon içeriği ve 1 reaksiyon için kullanım miktarları.

Malzeme İçeriği	(1x) Kullanım Miktarı
RealQ Plus 2x Master Mix	5µl
Primer F (Forward)	0.5µl
Primer R (Reverse)	0.5µl
Nükleaz içermeyen su	2µl
Örnek cDNA	2µl
Total Hacim	10µl

Tablo 3.4: qRT-PCR basamakları

	PCR Adımları			Melt Curve	
	1.Basamak	2.Basamak	3.Basamak	4.Basamak	5.Basamak
Sıcaklık	95°C	95°C	60°C	60°C	95°C
Süre	10 dk	15 sn	1 dk	5 sn	5 sn
Tekrar Sayısı	1	49		1	

Araştırma dahilinde çalışılan *STPG2* geni için üç çift, *RNF8*, *GTSF1* ve β - *Aktin* genleri için ise birer çift primer tasarımı yapılmış ve reaksiyonlar kurulurken her gen bölgesi için kendi primerlerini içeren mix'ler hazırlanmıştır. Gen bölgeleri için tasarlanan primer dizileri tablo 3.5'te verilmiştir. Aday genler için her örnek 2'şer tekrar olarak, kontrol geni olan β -*Aktin* ise 1'er kez çalışılmıştır. Her Plate'te, çalışılan gen bölgelerine özel hazırlanan master mixlerden ayrı ayrı 1'er tane de negatif kontrol olarak yüklenmiş ve içerisine cDNA örneği yerine nuclease free su konulmuştur. Daha sonra platelerin üzeri BioRad Microseal® 'B' optical adhesive seal ile kapatılmış ve plateler yaklaşık 10 saniye santrifüj edildikten sonra qRT-PCR cihazına konmuştur.

Tablo 3.5: Gen bölgeleri için tasarlanan primer dizileri.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
β - <i>Aktin</i>	5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'
<i>STPG2</i> - 2	5'-AGTACCAGATATGGTTATTCCAGC-3'	5'-TCTCATATGTTGCTGGGCCT-3'
<i>STPG2</i> - 3	5'-GGTCCTGCAGCATACAATCCT-3'	5'-CAGCAGCCATTTACCAATGAG-3'
<i>RNF8</i>	5'-ACCAAGGAAGAGAAGGAGAAGATGC-3'	5'-AGTTCAAGGTGACAGCCTCAATGAAG-3'
<i>GTSF1</i>	5'-GTTGTATTGAGCAAGATGTTGTCAACC-3'	5'-GGTCTGCTCCACAAATCTTTATCC-3'

3.7 Jel Elektroforez

Proje dahilinde deneylerin sağlıklı ilerleyişini kitlerin ve primerlerin, özellikle denenen *STPG2* geni primerlerinin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. %2'lik agaroz jel hazırlamak için 100mL 1x TBE (Tris Borik asit EDTA) solüsyonuna 2gr toz agaroz ilave edilerek ara ara karıştırılmıştır. Yaklaşık 2 dakika mikrodalgada ısıtılarak hazırlanan jel karışımına 15µl etidyum bromür (EtBr)

eklendikten sonra taraklı jel dökme tepsilerine dökülerek oda sıcaklığında soğutulularak dondurulmuştur. Hazırlanan jeller daha sonra 1x TBE tamponu ile doldurulmuş olan jel elektroforez tanklarına yerleştirilmiştir. Her reaksiyon için 10µl PCR ürünü 1µl yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir ve örnekler 90 Volt akım ile 20 dakika yürütülmüştür.

3.8 Transkriptom RNA Dizileme

Çalışma içerisinde erkek infertilitesinde etkin rol oynayabilecek aday genlerin belirlenmesi adına; toplanan dokulardan 8 hasta ve 8 kontrol dokusundan elde edilen total RNA örnekleri seçilerek transkriptom RNA dizileme (RNAseq) çalışması yapılmıştır. RNA depleasyonu, kütüphane oluşturulması, dizileme ve biyoinformatik analizden oluşan 4 aşamalı bu çalışmanın yürütülmesi için özel bir laboratuvar şirketi olan İntergen Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi, Ar-Ge bölümünden hizmet alımı yapılmıştır.

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen genetik bilgiler istatistiksel anlamlılığın sağlanması açısından $p < 0.05$ olacak şekilde ve ekspresyon farklılığının gözlemlenmesi açısından Log2fold farklılıkları 0.5'in üzerinde olacak şekilde filtrelenmiştir. Elde edilen RNA dizileri ile bağlantılı genler “GeneCards®”, “NCBI Gene”, “The Human Protein Atlas” ve “The Genotype-Tissue Expression (GTEx)” portalları kaynak gösterilerek incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda qRT-PCR çalışmalarında hem kanda hem de dokuda saptanabilecek düzeyde gen ekspresyonu olan ve projemiz ile bağlantılı bulunan genler arasından *GTSF1* ve *RNF8* genleri yeni hedef genler olarak seçilmiştir.

3.9 İstatistiksel Analiz

STPG2 geni ekspresyonu üzerine yapılan qRT-PCR deneyleri kayda alınabilecek derecede ekspresyon göstermedikleri için, projede değerlendirilmeye alınamamıştır. *RNF8*, *GTSF1* ve β -*Aktin* genleri üzerine yapılan qRT-PCR çalışmaları sonucunda elde edilen Cq değerlerinin her hasta için ortalaması alınmış ve yapılan istatistik testlerinde bu değerler ve ayrıca hesaplanan ΔCq değerleri kullanılmıştır. Öncelikle her aday gen için

örneklerin ΔC_q , $\Delta\Delta C_q$ ve $2^{-\Delta\Delta C_q}$ değerleri belirlenmiş ve ortalama $2^{-\Delta\Delta C_q}$ değerleri hesaplanarak farklılıkları gözlemlenmiştir. Çıkan değerlerin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterip göstermediğini belirlemek için; normal dağılım testi olarak “Shapiro-Wilk” testi, normal dağılım gösteren örnekler için “Student T-testi” ve normal dağılım göstermeyen örnekler için ise “Mann – Whitney U” testi uygulanmıştır. İstatistik testlerin uygulanması ve grafiklerin oluşturulması için IBM SPSS, Jamovi ve Excel programları kullanılmıştır.



4. BULGULAR

Bu çalışmada hasta grubunu, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı'nda idiopatik infertilite tanısı konulmuş olan 31 bireyden alınmış olan testis doku ve kan örnekleri oluşturmuştur. Kontrol grubunu ise; hem infertilite sebebi belli olan 9 erkek bireyden alınmış olan testis doku ve kan örnekleri hem de Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Kan Alım Merkezi'ne gelen 18-50 yaş aralığında, çocuk sahibi sağlıklı 32 erkek bireyden alınmış olan kan örnekleri oluşturmuştur. Alınan doku örnekleri patolojik incelemenden geçtikten sonra dokuların Johnsen skorları ve patolojik incelemeleri dikkate alınarak; hastalar hipospermatogenez (germ hücresi bulunan) ve SCO yani germ hücresi bulunmayan hastalar olarak iki gruba ayrılmıştır. Patolojik değerlendirmeleri içeren hasta listesi tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Yapılan qRT-PCR çalışmaları sonucunda 7 hastanın kan örnekleri; deneylerde problemlili çalışmaları ve değerlendirmeye alınabilecek şekilde sonuç vermemeleri sebebiyle istatistiksel değerlendirmeye dahil edilememiştir. Çalışma dışı bırakılan bu hastalar tablo 4.1'de gösterilen H6, H14, H15, H17, H20, H39 ve H40 numaralı hastalardır. Çalışma dışı bırakılmadan önce bu örnekler 2 ayrı qRT-PCR reaksiyonunda problemlili çalışmalarını takiben total RNA örneklerinden tekrar Revers Transkriptaz ile cDNA sentezleri yapılarak, qRT-PCR reaksiyonları yeni cDNA örnekleri ile tekrarlanmış ama sonuç değişiklik göstermemiştir. Bu nedenle istatistiksel testlerde; infertilite sebebi belli olan 8 erkek bireyden ve idiopatik infertiliteye sahip 25 bireyden alınmış olan testis doku ve kan örneklerinin sonuçları kullanılmıştır.

4.1 STPG2 Geni Ekspresyon Bulguları

Çalışmaya alınan hastaların qRT-PCR reaksiyonları her gen için ayrı primerler kullanılarak ayrı kuyucuklarda çalışılmıştır. Projenin başından beri hedeflenen *STPG2* geni için tasarlanan üç primer çifti de qRT-PCR'da başarılı bir gen amplifikasyonu göstermemiş, PCR ürünlerinde yeterli amplifikasyon olmadığı jel elektroforez ile de teyit edilmiştir. *STPG2* geni üzerine yapılan qRT-PCR reaksiyonlarının sonuçlarına örnekler şekil 4.1'de, jel elektroforez görüntüleri ise şekil 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.1 (A) : Hasta Listesi ve patolojik değerlendirmeler.

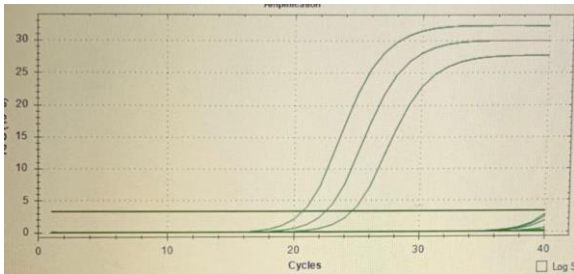
Hasta Numarası	Patoloji	Johnsen Skoru	Bilinen infertilite sebepleri
H1	1. Sertoli cell only		Y kromozomu AZF bölgesinde kısmi delesyon
	2. Peritübüler hyalinizasyon		
H2	1. İntratübüler germ hücreneoplazisi		Testis kanseri - ameliyat geçirmiş
	2. Peritübüler hyalinizasyon		
	3. İntraasiner Kalsifikasyon		
H3	Maturasyon duraklama	6	
H4	1. Sertoli cell only	2	
	2. Leydig hücre hiperplazisi		
H5	Sertoli cell only	2	
H6	Hipospermatogenez	8	
H7	Hipospermatogenez	8	
H8	1. Hipospermatogenez	8	
	2. Atrofik testis		
	3. Sertoli cell only		
	4. Leydig hücre hiperplazisi		
H9	1. Sertoli cell only	2	
	2. Bazal membran kalınlaşması		
	3. Atrofik testis		
H10	Hipospermatogenez	9	Y kromozomu AZF bölgesinde tam delesyon
H11	1. Sertoli cell only	2	
	2. Leydig hücre hiperplazisi		
H12	Hipospermatogenez	9	
H13	Hipospermatogenez	9	
H14	Sertoli cell only	2	
H15	1. Sertoli cell only	2	Kaba Kulak
	2. Leydig hücre hiperplazisi		
	3. Peritübüler hyalinizasyon		
H16	Hipospermatogenez	8	Varikozel yapılar görüldü
			Y kromozomu AZF c bölgesinde kısmi delesyon
H17	1. Sertoli cell only	2	
	2. Leydig hücre hiperplazisi		
H18	1. İnkomplet spermatositik arrest	6	
	2. Peritübüler hyalinizasyon		
H19	Sertoli hücrelerine benzer alanlar		
	hiperplastik Leydig hücreleri		
H20	Sertoli cell only	2	
H21	1. Sertoli cell only	2	Y kromozomu AZF c bölgesinde delesyon
	2. İnkomplet spermatositik arrest		
	3. Hidrosel kesesi ile uyumlu histopatolojik bulgular		
H22	1. Sertoli cell only	2	Klinefelter Erkek
	2. Lenfoid hücre hiperplazisi		
	3. Tübüler hyalinizasyon		
H23	Sertoli cell only	2	
H24	Hipospermatogenez	9	55 yaşında (Araştırma yaşı sınırının üstünde)
H25	Hipospermatogenez	9	
H26	Hipospermatogenez	6	CFTR geni 17A eksonik bölgesinde p.L937F/+ değişimi vardır
H27	Hipospermatogenez	8	
H28	Hipospermatogenez	9	
H29	Hipospermatogenez	7	Araçta atrofik seminifer tübüller izlenmiştir.
H30	İnkomplet spermatositik arrest	7	
H31	Hipospermatogenez	7	
H32	Hipospermatogenez	9	
H33	1. sertoli cell only	2	
	2. Leydig hücre hiperplazisi		
H34	Sertoli cell only	2	
H35	1. sertoli cell only	2	
	2. Bazal membran kalınlaşması		
H36	Hipospermatogenez	8	Artmış sperm DNA hasarı gözlemlenmiştir.
H37	Hipospermatogenez		
H38	Hipospermatogenez	8	
H39	1. İnkomplet spermatositik arrest	6	
	2. Peritübüler hyalinizasyon		
H40	Hipospermatogenez	8	

Tablo 4.1 (B) : İnfertil kontrol olarak belirlenen sebebi belli infertil bireyler.

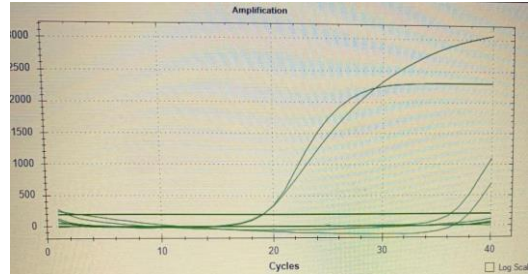
Hasta Numarası	Patoloji	Johnsen Skoru	Notlar
H1	1. Sertoli cell only 2. Peritübüler hyalinizasyon		Y kromozomu AZF bölgesinde kısmi delesyon
H2	1. İnrtatübüler germ hücreneoplazisi 2. Peritübüler hyalinizasyon 3. İntraasiner Kalsifikasyon		Testis kanseri - ameliyat geçirmiş
H10	Hipospematogenez	9	Y kromozomu AZF bölgesinde tam delesyon
H15	1. Sertoli cell only 2. Leydig hücre hiperplazisi 3. Peritübüler hyalinizasyon	2	Kaba Kulak
H16	Hipospematogenez	8	Varikozel yapılar gözlemlendi
			Y kromozomu AZF c bölgesinde kısmi delesyon
H21	1. Sertoli cell only 2. İnkomplet spermatositik arrest 3. Hidrosel kesesi ile uyumlu histopatolojik bulgular	2	Y kromozomu AZF c bölgesinde delesyon
H22	1. Sertoli cell only 2. Lenfoid hücre hiperplazisi 3. Tübüler hyalinizasyon	2	Klinefelter Erkek
H24	Hipospematogenez	9	55 yaşında (Araştırma yaş sınırının üstünde)
H26	Hipospematogenez	6	CFTR geni 17A ekzonik bölgesinde p.L997F/+ değişimi vardır

Tablo 4.1 (C) : İstatistiksel analiz dışı bırakılan hastalar.

Hasta Numarası	Patoloji	Johnsen Skoru	Notlar
H6	Hipospematogenez	8	
H14	Sertoli cell only	2	
H15	1. Sertoli cell only 2. Leydig hücre hiperplazisi 3. Peritübüler hyalinizasyon	2	Kaba Kulak
H17	1. Sertoli cell only 2. Leydig hücre hiperplazisi	2	
H20	Sertoli cell only	2	
H39	1. İnkomplet spermatositik arrest 2. Peritübüler hyalinizasyon	6	
H40	Hipospematogenez	8	

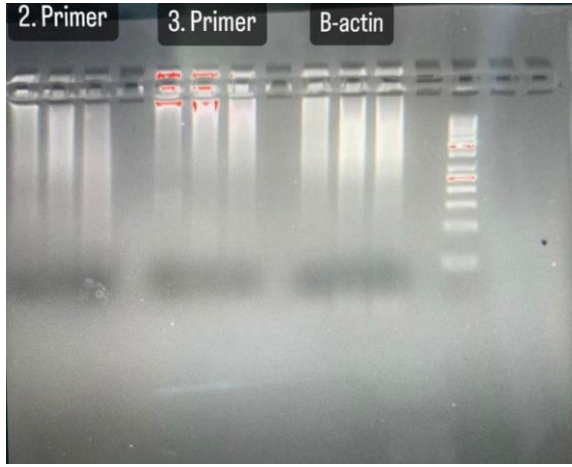


(A)



(B)

Şekil 4.1: Çalışmada denenen *STPG2* primer2 ve primer3 ve kontrol geni β -*aktin*'in qRT-PCR çalışma örnekleri. (A) Grafikte görülen 3 yükseliş kontrol genimiz β -*aktin*'e aittir, hedef gene ait dizayn edilen primer-2 ve primer-3 ile yapılan çalışmada *STPG2* geninde amplifikasyon görülmektedir. (B) Grafikte görülen 2 yükseliş yine β -*aktin* genine ait olup, hedef gene ait primerle ile yapılan çalışmada *STPG2* geninde amplifikasyon saptanamamıştır.



(A)



(B)

Şekil 4.2: Yukarıdaki görsellerde şekil 4.1’de grafikleri verilen PCR reaksiyon ürünlerinin agaroz jel’de yürütülmesi gösterilmiştir. *β-aktin* gen bölgesi belirgin bant verirken hedef genlerde bant belli belirsiz görünmüştür.

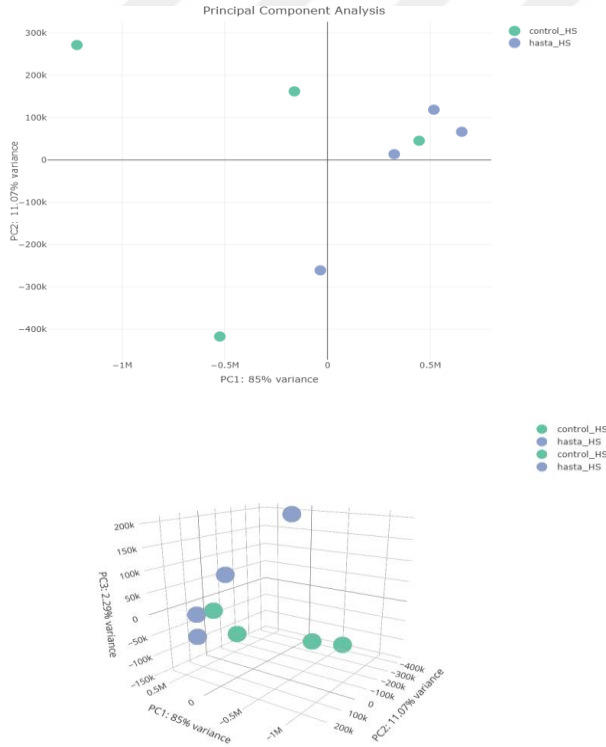
4.2 Transkriptom Çalışması ile Belirlenen Aday Genlerin Bulguları

Transkriptom çalışması için seçilen 8 idiyopatik infertilite tanısı almış hastadan alınan doku ve 8 sebebi bilinen infertil kontrolden alınan doku örnekleri kullanılmıştır. Bu gruplar kendi içlerinde 4 hipospermatogenez ve 4 sertoli cell only olacak şekilde ayrılarak, tanılarına göre karşılaştırılma yapılmıştır.

Testis dokularından elde edilen total RNA örnekleri kullanılarak yürütülen bu çalışma sonucunda otuz beş bin’den fazla RNA dizisi sekanslanarak ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. Tezde öncelikle ekspresyon profilinde değişiklik beklediğimiz ve qRT-PCR ile başarılı sonuç elde edemediğimiz *STPG2* geninin RNAseq çalışma sonuçları incelendiğinde *STPG2* geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Dolayısıyla projenin devam ettirilebilmesi adına, RNAseq çalışmasından elde edilen sonuçlar dokular arasında karşılaştırılarak farklılık gösteren yeni aday genler taranmıştır.

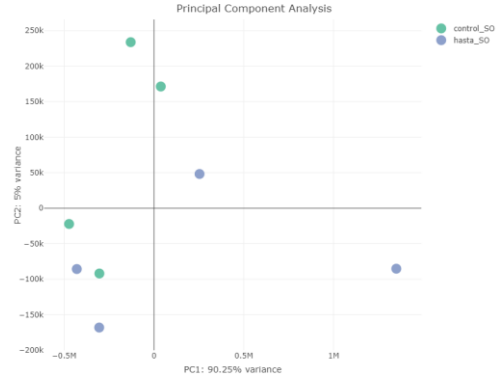
İdiyopatik ve infertilite sebebi belli olan bireyler arasında yapılan karşılaştırmada hipospermatogenez tanılı bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken SCO

gözlemlenen bireyler arasında bazı genlerde ekspresyon farklılıkları saptanmıştır. Hipospermatogenez dokular için alınan sonuçlar şekilde 4.3'te, SCO dokularla ulaşılan sonuçlar ise şekil 4.4'te verilmiştir. Bu sonuçlar ışığında yeni aday genlerin belirlenmesi için patolojik olarak SCO tanılı, idiyopatik ve sebebi bilinen infertilite grupları arasında fark göstermiş olan genler taranmıştır. Taranan gen listeleri Log2fold değeri ve p değeri filtreleri kullanılarak hedef gen sayısı daraltılmıştır. Daha sonra genler hücresel yollara göre incelenerek erkek infertilitesiyle ilgili olabilecek, SCO dokular arasında anlamlı farklılık göstermiş olan genler seçilmiştir. Seçilen genler ise daha sonra gen özellikleri, protein üretimleri ve doku ekspresyon seviyeleri açısından incelenmiştir. Yapılan bu çalışmanın ardından gen fonksiyonu ve doku ekspresyon seviyesi açısından tez projesine en uygun bulunan ve RNAseq çalışması sonucunda spermatogenez yolağında yer alan *GTSF1* ve *RNF8* genleri seçilmiş ve bu genler için primer dizaynı yapılarak hasta ve kontrol gruplarında qRT-PCR çalışmaları yapılmıştır.

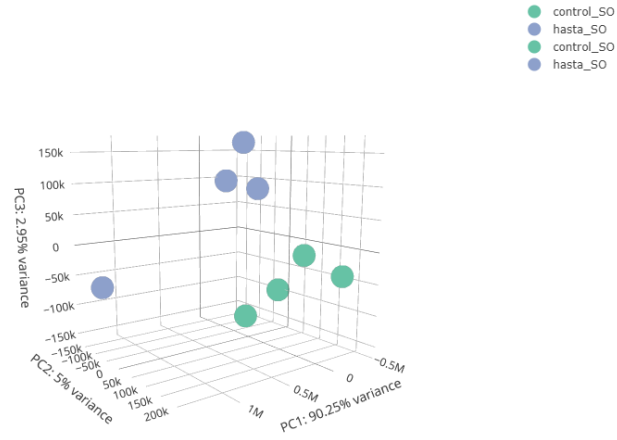


Şekil 4.3Yukardaki 2D ve 3D şekillerden de görülebildiği üzere kontrol (yeşil) ve hasta (mavi) RNA ekspresyon dağılımlarında belirgin farklılık gözlenmemektedir

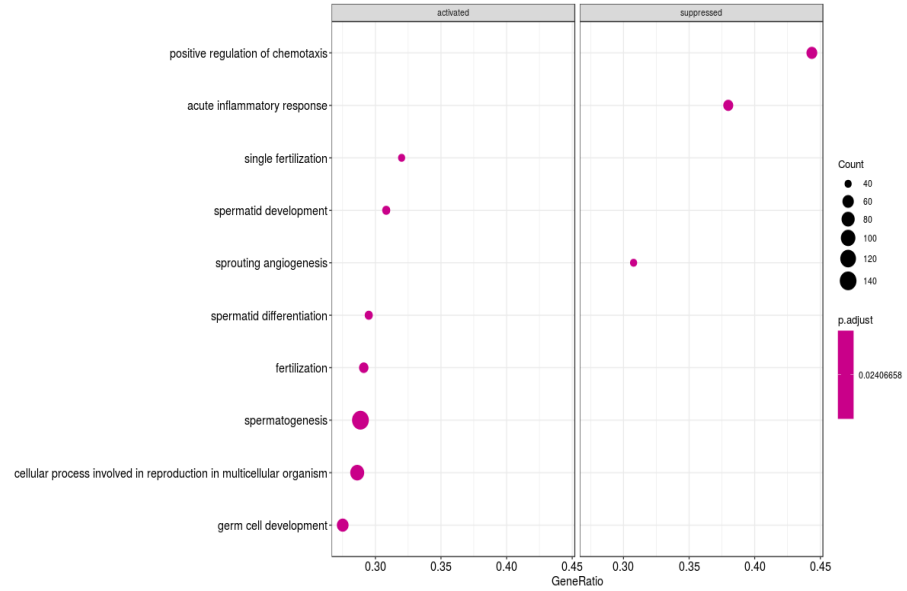
(A)



(B)



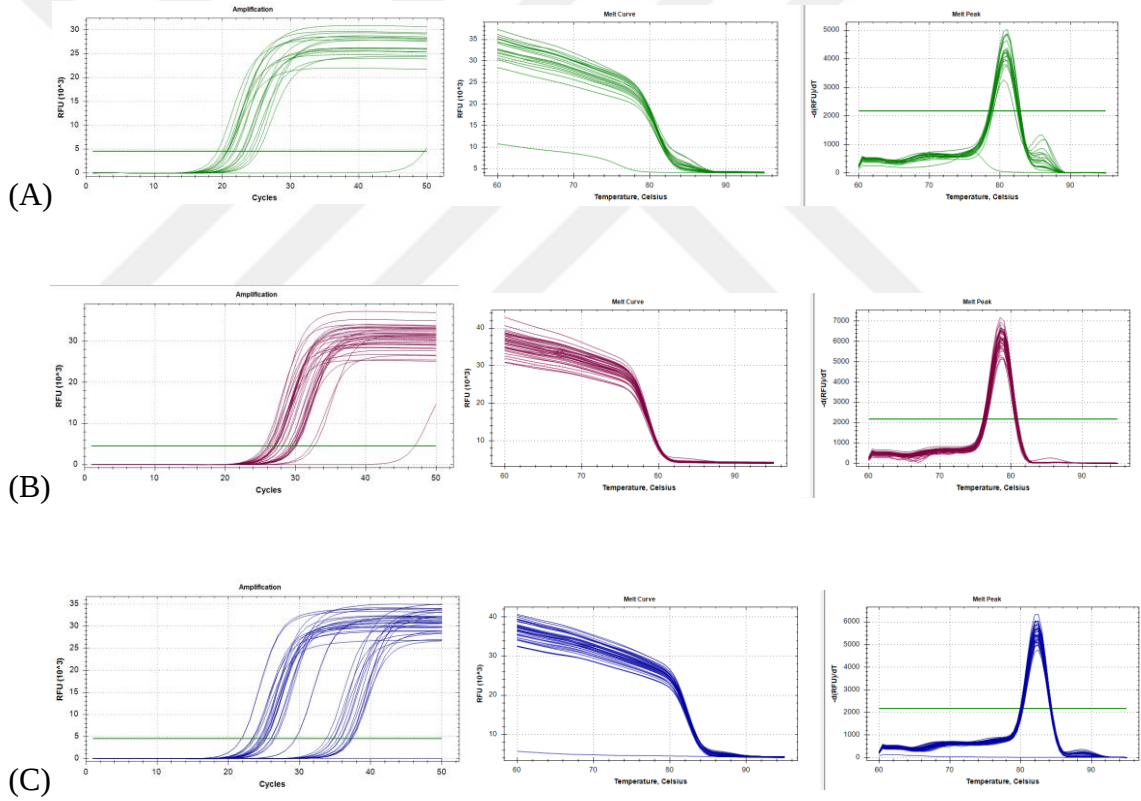
(C)



Şekil 4.4: RNAseq gen ekspresyon grafikleri. Verilen grafiklerde (A), (B) SCO tanısı almış hastalarda gen ekspresyon seviyelerinin farklılığını göstermektedir. (C) grafiğinde ise farklılık gösteren genlerin bazılarının katıldıkları hücresel yollar gösterilmiştir. Noktaların boyutları gen sayısını belirtmektedir.

4.3 RNF8 ve GTSF1 Genlerini Cq Değeri Bulguları

Çalışma dahilinde, her örnek qRT-PCR’da 2 kez çalışılmıştır ve istatistik analizlerde kullanılmak üzere elde edilen bu 2 Cq değerinin ortalaması hesaplanmıştır. Örneklerin qRT-PCR çalışma görüntüleri şekil 4.5’te, Cq değerleri ve ortalamaları tablo 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.5: Proje dahilinde araştırılan hedef genler ve kontrol genin qRT-PCR çalışmalarından örnekler gösterilmiştir. Soldan sağa sırayla genlerin amplifikasyon eğrileri, erime eğrileri ve erime pik noktalarının grafikleri verilmiştir. (A) *β-aktin*, (B) *RNF8* ve (C) *GTSF1* genlerini göstermektedir. *β-aktin* ve *RNF8* genlerinin negatif kontrol örneklerinin grafiklerinde görülen yükselmeler, her reaksiyonda tekrarlanması, geç yükselme göstermesi ve erime eğrilerinin gen seviyelerinden farklı olmaları sebebiyle dimer oluşumlarını gösterdikleri kanısına varılarak anlamsız kabul edilmiştir.

Tablo 4.2: *RNF8* ve *GTSF1* genlerinin ortalama Cq değerleri tüm örnekler için gösterilmiştir.

<i>RNF8</i>	Cq ORTALAMA		<i>GTSF1</i>	Cq ORTALAMA	<i>RNF8</i>	Cq ORTALAMA		<i>GTSF1</i>	Cq ORTALAMA
H3 Doku	28.76		H3 Doku	25.52	Kontrol Doku				
H4 Doku	27.45		H4 Doku	37.43	H1 Doku	33.03		H1 Doku	37.62
H5 Doku	26.69		H5 Doku	34.83	H2 Doku	30.52		H2 Doku	27.1
H7 Doku	27.73		H7 Doku	24.3	H10 Doku	28.89		H10 Doku	25.25
H8 Doku	26.85		H8 Doku	24.39	H16 Doku	29.46		H16 Doku	25.68
H9 Doku	27.58		H9 Doku	36.12	H21 Doku	27.26		H21 Doku	29.36
H11 Doku	28.17		H11 Doku	37.55	H22 Doku	30.21		H22 Doku	36.69
H12 Doku	27.74		H12 Doku	24.03	H24 Doku	28.92		H24 Doku	24.68
H13 Doku	30.22		H13 Doku	25.93	H26 Doku	26.45		H26 Doku	23.48
H18 Doku	30.13		H18 Doku	26.59	Hasta Kontrol Kanları		H Kontrol Kan		
H19 Doku	29.84		H19 Doku	36.11	H1 Kan	35.43		H1 Kan	33.55
H23 Doku	29.52		H23 Doku	37.8	H2 Kan	37.15		H2 Kan	36.73
H25 Doku	28.04		H25 Doku	24.5	H10 Kan	31.97		H10 Kan	32.85
H27 Doku	28.01		H27 Doku	23.69	H16 Kan	33.72		H16 Kan	33.86
H28 Doku	30.83		H28 Doku	26.83	H21 Kan	31.72		H21 Kan	31.77
H29 Doku	27.81		H29 Doku	25.21	H22 Kan	33.03		H22 Kan	33.68
H30 Doku	27.51		H30 Doku	24.8	H24 Kan	39.74		H24 Kan	35.07
H31 Doku	25.95		H31 Doku	22.85	H26 Kan	32.21		H26 Kan	33.22
H32 Doku	29.3		H32 Doku	25.46	Fertil Kontrol Kanları		Fertil Kontrol Kan		
H33 Doku	30.32		H33 Doku	33.42	K1	32.05		K1	33.7
H34 Doku	26.98		H34 Doku	29.39	K2	30.37		K2	31.71
H35 Doku	26.93		H35 Doku	27.67	K3	33.91		K3	34.87
H36 Doku	26.48		H36 Doku	23.86	K4	30.73		K4	31.64
H37 Doku	27.67		H37 Doku	25.02	K5	33.15		K5	34.16
H38 Doku	25.71		H38 Doku	23.49	K6	30.71		K6	32.08
Hasta Kanları			Hasta Kan		K7	31.47		K7	32.54
H3 Kan	32.74		H3 Kan	34.04	K8	34.41		K8	36.61
H4 Kan	36.19		H4 Kan	37.52	K9	33.89		K9	34.68
H5 Kan	33.96		H5 Kan	33.56	K10	32.22		K10	33.76
H6 Kan			H6 Kan		K11	32.83		K11	34.25
H7 Kan	34.96		H7 Kan	35.58	K12	31.55		K12	33.56
H8 Kan	35.8		H8 Kan	35.45	K13	32.61		K13	33.77
H9 Kan	34.81		H9 Kan	34.92	K14	31.31		K14	33.11
H11 Kan	35.33		H11 Kan	35.38	K15	35.87		K15	39.11
H12 Kan	38.1		H12 Kan	37.09	K16	33.9		K16	33.5
H13 Kan	33.65		H13 Kan	34.81	K17	32.43		K17	33.28
H14 Kan			H14 Kan		K18	31.45		K18	32.76
H15 Kan			H15 Kan		K19	32.33		K19	32.89
H17 Kan			H17 Kan		K20	31.18		K20	32.23
H18 Kan	35.55		H18 Kan	35.89	K21	31.72		K21	32.64
H19 Kan	35.17		H19 Kan	36.14	K22	32.28		K22	34.12
H20 Kan			H20 Kan		K23	32.61		K23	34.08
H23 Kan	35.65		H23 Kan	37.16	K24	33.66		K24	33.88
H25 Kan	37.3		H25 Kan	36.67	K25	32.21		K25	33.53
H27 Kan	36.63		H27 Kan	35.22	K26	31.27		K26	32.1
H28 Kan	31.26		H28 Kan	32.46	K27	37.24		K27	36.43
H29 Kan	31.29		H29 Kan	32.8	K28	32.47		K28	34.47
H30 Kan	33.62		H30 Kan	32.59	K29	32.27		K29	33.28
H31 Kan	31.14		H31 Kan	33.15	K30	34.33		K30	34.77
H32 Kan	34.99		H32 Kan	34.7	K31	32.55		K31	34
H33 Kan	33.34		H33 Kan	33.47	K32	37.14		K32	36.22
H34 Kan	33.58		H34 Kan	34.03					
H35 Kan	35.28		H35 Kan	36					
H36 Kan	33.61		H36 Kan	34.43					
H37 Kan	33.47		H37 Kan	34.9					
H38 Kan	32.73		H38 Kan	32.7					

Örneklerin qRT-PCR sonucu Cq değerleri kullanılarak yapılan istatistiksel testlerde öncelikle infertil erkeklerden alınan kan örnekleri ile fertil erkek bireylerden alınan kan örneklerinin değerleri karşılaştırılmıştır. İlk olarak; örneklerin normal dağılıma uyup uymadığını kontrol etmek için Shapiro – Wilk testi yapılmış ve istatistiksel olarak anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir (Tablo 4.3(A)). Grup ölçütleri ortanca (25. Persentil – 75. Persentil) olarak gösterilmiştir (Tablo 4.3(B)). Test sonucunda iki grubun da p değerleri 0.05’in altında oldukları için değerlerin normal dağılımda olmadıkları belirlenmiştir. Dolayısıyla örnekleri karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır (Tablo 4.3(C)). Çalışılan 2 gen için de $p < 0.05$ olduğu için, hasta kanları ile kontrol kanlarının gen ekspresyon seviyelerinde farklılık olduğu kabul edilmiştir (şekil 4.5).

İnfertil hasta ve fertil kontrol bireylerinin kan örnekleri karşılaştırıldıktan sonra infertil bireylerin kan örnekleri kendi aralarında idiyopatik infertil olgular ve infertilite sebebi bilinen olgular olarak gruplandırılarak karşılaştırılmıştır. Sebebi bilinen infertilite grubu sadece 8 kişiden oluştuğu için Shapiro – Wilk testine bakılmaksızın Mann – Whitney U testi yapılmıştır. Test sonucunda $p > 0.05$ olduğu için gruplar arasında bir farklılık olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.3: Tez kapsamında araştırılan genlerin hasta ve kontrol kanlarında Cq değerlerinin normal dağılım (A) ve örneklerin karşılaştırmalı analizi (B), (C) gösterilmiştir.

(A)

Grup		Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.
<i>RNF8</i> kan	Hasta	.970	33	.477
	Kontrol	.893	32	.004
<i>GTSF1</i> kan	Hasta	.972	33	.534
	Kontrol	.900	32	.006

(B)

Grup			Persentil Değerleri
Weighted Average(Definition 1)	<i>RNF8</i> kan	Hasta	33.9600
		Kontrol	32.3800
	<i>GTSF1</i> kan	Hasta	34.7000
		Kontrol	33.7300
Tukey's Hinges	<i>RNF8</i> kan	Hasta	33.9600
		Kontrol	32.3800
	<i>GTSF1</i> kan	Hasta	34.7000
		Kontrol	33.7300

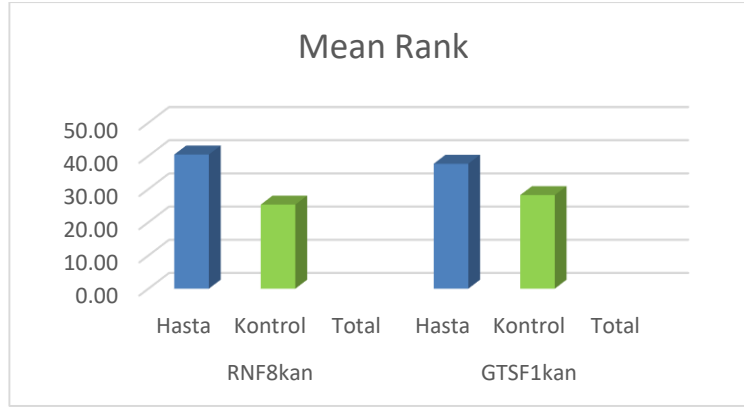
(C)

Ranks

Grup		N	Mean Rank	Sum of Ranks
<i>RNF8</i> kan	Hasta	33	40.42	1334.00
	Kontrol	32	25.34	811.00
	Total	65		
<i>GTSF1</i> kan	Hasta	33	37.65	1242.50
	Kontrol	32	28.20	902.50
	Total	65		

Test Statistics^a

	<i>RNF8</i> kan	<i>GTSF1</i> kan
Mann-Whitney U	283.000	374.500
Wilcoxon W	811.000	902.500
Z	-3.215	-2.014
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001	.044



Şekil 4.6: Yukarıdaki grafikte *RNF8* ve *GTSF1* genleri için infertil hasta bireyler ve fertil kontrol bireylerden alınan kan örneklerinden çalışılan qRT-PCR testleri sonuçlarının sıra ortalamaları (mean rank) verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere; her iki gen için de hasta kanları Cq değerleri ortalaması kontrol kanları Cq değerleri ortalamasından yüksektir.

Daha sonra infertil bireyler patolojik tanılarına göre yani hipospermatogenez ve SCO tanısına göre gruplandırılarak karşılaştırılmıştır. Normal dağılım testi olarak Shapiro – Wilk testi yapılmış (Tablo 4.4(A)) ve $p > 0.05$ sonucundan dolayı örneklerin normal dağılımda oldukları hipotezi kabul edilerek Student T-testi yapılmıştır. T- testi sonucunda p değerleri 0.05’in üzerinde oldukları için kan örneklerinde bir ekspresyon farkı gözlemlenmemiştir (Tablo 4.4 (B)).

Tablo 4.4: İnfertil bireylerin kan örneklerinde tanısal ekspresyon farklılıkları için yapılan istatistiksel testler. (A) Normal dağılım için Shapiro – Wilk testi (B) Student T-testi

Tani		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
RNF8kan	SCO	.938	11	.501
	Hipospermatogenez	.955	22	.403
GTSF1kan	SCO	.940	11	.525
	Hipospermatogenez	.943	22	.226

(A)

		Independent Samples Test					
		t-test for Equality of Means					
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Interval of the Difference Lower Upper
RNF8kan	Equal variances assumed	-.009	31	.993	-.00727	.77317	-1.58417 1.56962
	Equal variances not assumed	-.011	30.151	.991	-.00727	.65081	-1.33613 1.32159
GTSF1kan	Equal variances assumed	.137	31	.892	.07864	.57538	-1.09485 1.25213
	Equal variances not assumed	.129	17.258	.899	.07864	.61097	-1.20894 1.36621

(B)

Kan örneklerinden sonra doku örnekleri de öncelikle idiyopatik ve sebebi belli olan infertilite olarak gruplara ayrılarak karşılaştırılmıştır. Sebebi belli olan infertilite grubu 8 örnekten oluştuğu için normal dağılım testi yapılmaya gerek duyulmadan Mann – Whitney U testi yapılmıştır. Grupların ortanca Persentil (25. – 75. Persentil) değerleri farklılık gösterse de Mann- Whityney U testi sonucunda $p>0.05$ olduğu için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Grupların persentil değerleri ve istatistiksel testleri tablo 4.5’te verilmiştir.

Tablo 4.5: İnfertil bireylerin doku örneklerinden elde edilen Ct değerlerinin tanısal gruplar arasında değerlendirilmesi.

Altgrup			Persentil Değerleri	
Weighted Average (Definition 1)	RNF8doku	Sebebi bilinen	29.1900	29.1900
		İdiyopatik	27.7400	27.7400
	GTSF1doku	Sebebi bilinen	26.3900	26.3900
		İdiyopatik	25.5200	25.5200
Tukey's Hinges	RNF8doku	Sebebi bilinen	29.1900	29.1900
		İdiyopatik	27.7400	27.7400
	GTSF1doku	Sebebi bilinen	26.3900	26.3900
		İdiyopatik	25.5200	25.5200

Test Statistics ^a		
	RNF8doku	GTSF1doku
Mann-Whitney	65.000	88.000
Wilcoxon W	390.000	413.000
Z	-1.470	-.504
Asymp. Sig. (2-	.141	.614
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.150 ^b	.636 ^b

Sonrasında infertil bireylerden alınan doku örneklerinden elde edilen Ct değerleri patolojik tanılarına göre; hipospermatogenez ve SCO olarak iki gruba ayrılarak karşılaştırılmıştır. Yapılan Shapiro-Wilk testi $p<0.05$ değeri elde edildiği için örneklerin normal dağılıma uymadığı kabul edilerek Mann-Whitney U testi yapılmıştır. İstatistiksel testler sonucunda *RNF8* geninde bir farklılık görülmezken, *GTSF1* geninde ise hipospermatogenez gözlenen olgulara göre SCO belirlenen olgularda Cq değerlerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.6). *RNF8* geninde $p>0.05$ olduğu için doku örnekleri arasında bir farklılık olmadığı, *GTSF1* geninde ise $p<0.05$ olduğu için dokular arasında ekspresyon farklılığı olduğu kabul edilmiştir. Görülen farklılık şekil 4.1’de gösterilmiştir.

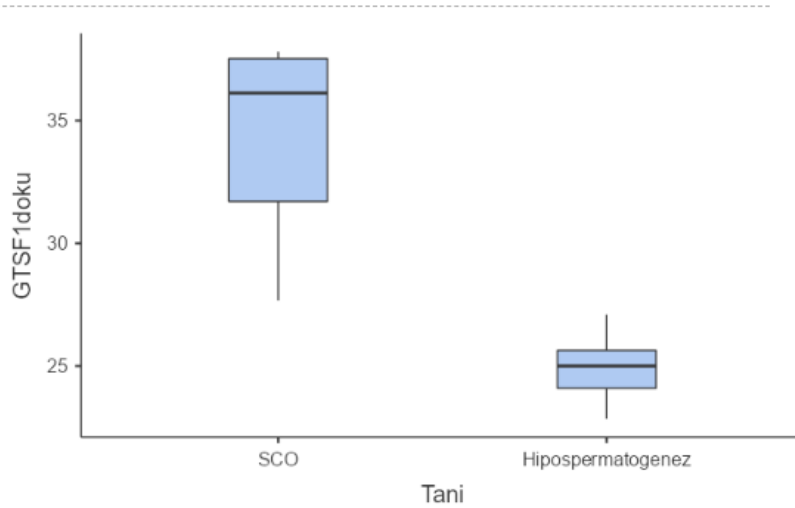
Tablo 4.6: İnfertil bireylerin doku örneklerinden elde edilen Cq değerlerinin patolojik tanılarına göre karşılaştırılması.

Test Statistics		
	RNF8doku	GTSF1doku
Mann-Whitney U	120.000	5.000
Wilcoxon W	186.000	258.000
Z	-.038	-4.430
Asymp. Sig. (2-	.970	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.985 ^b	.000 ^b

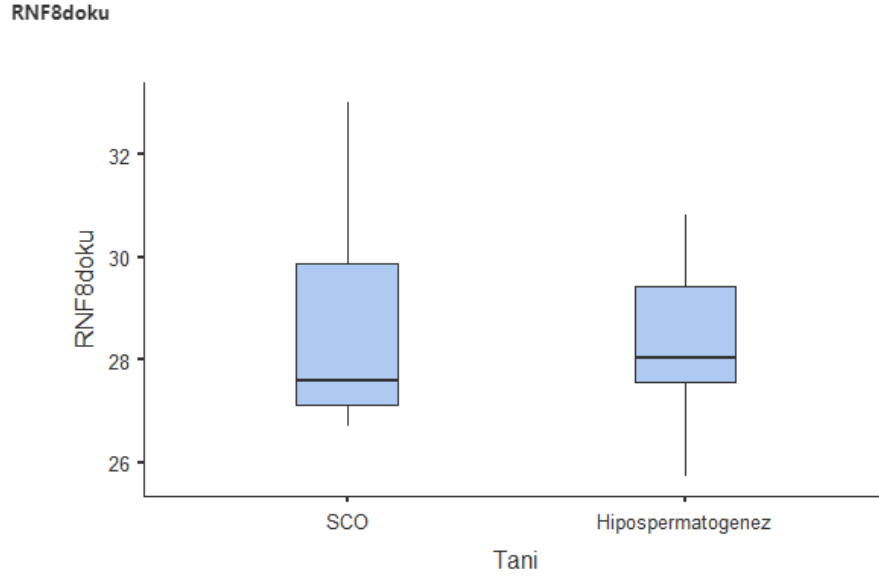
Ranks				
Tani		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RNF8doku	SCO	11	16.91	186.00
	Hipospematogenez	22	17.05	375.00
	Total	33		
GTSF1doku	SCO	11	27.55	303.00
	Hipospematogenez	22	11.73	258.00
	Total	33		

(A)

GTSF1doku



(B)



Şekil 4.7: Yukarıdaki şekillerde (A) *GTSE1* ve (B) *RNF8* genlerinde patolojik olarak gruplandırılan doku örneklerinin Cq değerleri farklılıkları boxplot grafikleriyle gösterilmiştir. Şekillerde görüldüğü üzere; *RNF8* geni değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmezken, *GTSE1* geni değerlerinde farklılıklar ortaya çıkmıştır.

4.4 *RNF8* ve *GTSE1* Genlerini ΔCq Değeri Bulguları

ΔCq değeri, hedef genin ortalama Cq değerinden kontrol genin Cq değeri çıkarılarak elde edilen farka verilen isimdir. Bu çalışma için ΔCq formülü; “ $\Delta Cq = RNF8/GTSE1$ ortalama Cq değeri – β -aktin Cq değeri” olarak kullanılmıştır. İstatistiksel testlerde ΔCq değerinin kullanılmasının, örneklerin konsantrasyon farkı veya qRT-PCR reaksiyonları arasındaki eşik değerleri değişkenliği gibi sonuçlarda farklılık yaratabilecek faktörleri eleyerek Cq değerleri ile farklı istatistiksel sonuçlar verebileceği savunulmaktadır (Ruiz-Villalba ve ark., 2021). Bu çalışmada, Cq değerleri kullanımı ve ΔCq değerleri kullanımı arasında elde edilen sonuçların farklı olup olmayacağının araştırılması için, ortalama Cq değerleri ile yapılmış olan istatistiksel testler ΔCq değerleri kullanılarak tekrar edilmiştir. Bulguların ΔCq değerleri tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.7: qRT-PCR reaksiyonu bulgularının ΔCq değerleri.

RNF8	ΔCq	RNF8	ΔCq	GTSF1	ΔCq	GTSF1	ΔCq
H3 Doku	4.38	Kontrol Dokular		H3 Doku	1.73	Kontrol Doku	
H4 Doku	6.19	H1 Doku	7.09	H4 Doku	16.23	H1 Doku	11.68
H5 Doku	6.78	H2 Doku	7.06	H5 Doku	14.32	H2 Doku	3.64
H7 Doku	5.29	H10 Doku	7.48	H7 Doku	1.87	H10 Doku	3.83
H8 Doku	6.21	H16 Doku	4.52	H8 Doku	4.35	H16 Doku	0.73
H9 Doku	6.54	H21 Doku	5.84	H9 Doku	15.08	H21 Doku	7.34
H11 Doku	5.93	H22 Doku	7.46	H11 Doku	15.3	H22 Doku	13.93
H12 Doku	4.42	H24 Doku	5.6	H12 Doku	0.71	H24 Doku	1.56
H13 Doku	4.83	H26 Doku	5.19	H13 Doku	0.55	H26 Doku	2.22
H18 Doku	5.61			H18 Doku	2.08		
H19 Doku	6.85	H Kontrol Kanları		H19 Doku	13.12	H Kontrol Kan	
H23 Doku	6.08	H1 Kan	12.2	H23 Doku	14.35	H1 Kan	10.33
H25 Doku	4.43	H2 Kan	10.7	H25 Doku	0.89	H2 Kan	10.23
H27 Doku	4.81	H10 Kan	10.5	H27 Doku	0.49	H10 Kan	11.34
H28 Doku	5.09	H16 Kan	11	H28 Doku	1.08	H16 Kan	11.14
H29 Doku	5.16	H21 Kan	10.5	H29 Doku	2.56	H21 Kan	10.54
H30 Doku	5.1	H22 Kan	10.9	H30 Doku	2.4	H22 Kan	11.56
H31 Doku	5.03	H24 Kan	15.2	H31 Doku	1.93	H24 Kan	10.55
H32 Doku	3.74	H26 Kan	10.5	H32 Doku	-0.1	H26 Kan	11.51
H33 Doku	6.74	Fertil Kontrol Kanları		H33 Doku	9.84	Fertil Kontrol Kanları	
H34 Doku	5.77	K1	10.2	H34 Doku	8.77	K1	11.88
H35 Doku	6.18	K2	9.67	H35 Doku	6.32	K2	11.01
H36 Doku	4.56	K3	10.9	H36 Doku	1.94	K3	11.82
H37 Doku	6.03	K4	9.34	H37 Doku	3.44	K4	10.85
H38 Doku	4.82	K5	10.9	H38 Doku	2.6	K5	11.93
Hasta Kanları		K6	9.68	Hasta Kanları		K6	11.04
H3 Kan	11.55	K7	9.36	H3 Kan	12.84	K7	11.03
H4 Kan	11.15	K8	10.3	H4 Kan	12.48	K8	12.47
H5 Kan	10.73	K9	10.2	H5 Kan	10.33	K9	11.03
H6 Kan		K10	9.94	H6 Kan		K10	11.43
H7 Kan	11.84	K11	10.5	H7 Kan	12.46	K11	11.94
H8 Kan	11.39	K12	10.1	H8 Kan	11.64	K12	12.1
H9 Kan	11.58	K13	10.2	H9 Kan	11.69	K13	11.38
H11 Kan	10.16	K14	9.82	H11 Kan	10.21	K14	11.62
H12 Kan	11.03	K15	11.1	H12 Kan	10.02	K15	14.3
H13 Kan	10.63	K16	10.8	H13 Kan	11.79	K16	10.41
H14 Kan		K17	10.3	H14 Kan		K17	11.13
H15 Kan		K18	10.1	H15 Kan		K18	11.39
H17 Kan		K19	10.7	H17 Kan		K19	11.25
H18 Kan	11.05	K20	10.1	H18 Kan	11.4	K20	11.12
H19 Kan	11.06	K21	10.6	H19 Kan	12.03	K21	11.47
H20 Kan		K22	10.6	H20 Kan		K22	12.39
H23 Kan	12.01	K23	10.5	H23 Kan	13.52	K23	11.98
H25 Kan	12.57	K24	10.7	H25 Kan	11.94	K24	10.95
H27 Kan	11.3	K25	10.9	H27 Kan	9.89	K25	12.18
H28 Kan	10.11	K26	10.8	H28 Kan	11.31	K26	11.64
H29 Kan	9.57	K27	11.3	H29 Kan	11.09	K27	10.53
H30 Kan	11.14	K28	10.4	H30 Kan	10.1	K28	12.37
H31 Kan	9.44	K29	10.7	H31 Kan	11.45	K29	11.67
H32 Kan	11.87	K30	12	H32 Kan	11.57	K30	12.4
H33 Kan	11.32	K31	10.4	H33 Kan	11.45	K31	11.82
H34 Kan	11.01	K32	11.8	H34 Kan	11.46	K32	10.86
H35 Kan	9.87			H35 Kan	10.59		
H36 Kan	10.92			H36 Kan	11.74		
H37 Kan	10.18			H37 Kan	11.62		
H38 Kan	9.45			H38 Kan	9.41		

Öncelikle infertil bireylere ait kan örnekleri ile fertil kontrol kanlarının ΔCq değerleri karşılaştırılmıştır. Sonuçların normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro-Wilk testi ile belirlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Grup ölçütleri ortanca (25. Persentil – 75. Persentil) olarak gösterilmiştir (tablo 4.8 (A)). Test sonucunda iki grubun da p değerleri 0.05’in altında oldukları için değerlerin normal dağılımda olmadıkları belirlenmiştir (tablo 4.8(B)). Dolayısıyla fertil ve infertil bireylerin kan örneklerinin karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi yapılmıştır, yapılan bu testin sonuç değerleri tablo 4.8 (C)’de verilmiştir. Test sonucunda *RNF8* geni ekspresyonunda $p < 0.05$ değeri elde edildiğinden gruplar arasında fark görülürken, *GTSF1* geninde $p > 0.05$ olduğu için anlamlı bir ekspresyon farkına rastlanmamıştır (şekil 4.7).

Tablo 4.8: İnfertil ve fertil erkek bireylerin kan örneklerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması için yapılan Shapiro-Wilk ve Mann-Whitney U testleri sonuçları.

(A)

Grup			Persentil Değerleri
Weighted Average(Definition 1)	<i>RNF8</i> kan	Hasta	11.01
		Kontrol	10.44
	<i>GTSF1</i> kan	Hasta	11.45
		Kontrol	11.555
Tukey's Hinges	<i>RNF8</i> kan	Hasta	11.01
		Kontrol	10.44
	<i>GTSF1</i> kan	Hasta	11.45
		Kontrol	11.555

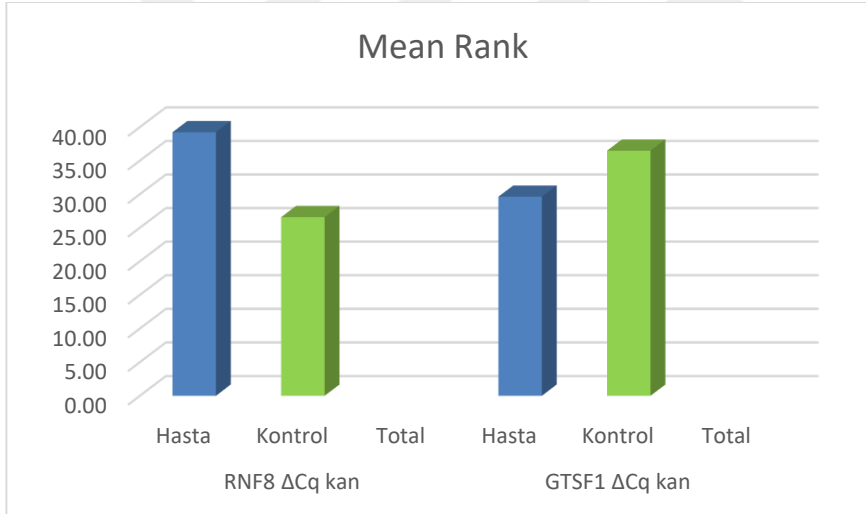
(B)

Grup		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
<i>RNF8</i> kan ΔCq	Hasta	.876	33	.001
	Kontrol	.943	32	.092
<i>GTSF1</i> kan ΔCq	Hasta	.968	33	.429
	Kontrol	.900	32	.006

Ranks				
Grup		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RNF8 ΔCq kan	Hasta	33	39.23	1294.50
	Kontrol	32	26.58	850.50
	Total	65		
GTSF1 ΔCq kan	Hasta	33	29.62	977.50
	Kontrol	32	36.48	1167.50
	Total	65		

(C)

	RNF8 ΔCq kan	GTSF1 ΔCq kan
Mann-Whitney U	322.500	416.500
Wilcoxon W	850.500	977.500
Z	-2.697	-1.463
Asymp. Sig. (2-	.007	.143



Şekil 4.8: Yukarıdaki grafikte görüldüğü üzere infertil hasta ve fertil kontrol gruplarının kan örnekleri ΔCq değerleri arasında *RNF8* geninde belirgin bir fark görülürken, *GTSF1* geninde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Daha sonra doku ve kan örnekleri idiyopatik ve sebebi bilinen infertilite olguları olarak iki gruba ayrılmış ve kendi aralarında test edilmiştir. Sebebi bilinen infertilite grubunun 8 üyeden oluşmasından dolayı örneklerde normal dağılım olamayacağından, Shapiro-Wilk testine bakılmaksızın örnekler Mann-Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Tablo 4.9’de de gösterildiği üzere tüm grularda $p > 0.05$ olduğu için gruplar arasında anlamlı bir farklılık ortaya çıkmamıştır.

Tablo 4.9: İdiyopatik infertilite ve sebebi belli olan infertilite hastalarının kan ve doku örneklerinin istatistik test sonuçları.

Test Statistics ^a				
	<i>RNF8</i> Doku ΔCq	<i>RNF8</i> Kan ΔCq	<i>GTSF1</i> Doku ΔCq	<i>GTSF1</i> Kan ΔCq
Mann-Whitney U	57.000	97.000	93.000	65.500
Wilcoxon W	382.000	133.000	418.000	101.500
Z	-1.806	-.126	-.294	-1.450
Asymp. Sig. (2-tailed)	.071	.900	.769	.147
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.074 ^b	.918 ^b	.789 ^b	.150 ^b

Hastalar patolojik tanılarına göre gruplandırıldıklarında ise Cq değerleri ile yapılan testlerden farklı olarak ΔCq değerlerinde sadece *GTSF1* geni doku örneklerinde değil, *RNF8* geni doku örneklerinde de farklılık görülmüştür. Hastalar patolojik tanılarına göre hipospermatogenez ve SCO olarak gruplandırıldıklarında öncelikle Shapiro-Wilk testi ile normal dağılıma uyup uymadıklarında bakılmaktadır. Bu test sonucunda *RNF8* geni doku örnekleri ile *GTSF1* geni kan örnekleri normal dağılıma uyarken, *GTSF1* geni doku örnekleri ve *RNF8* geni kan örneklerinin normal dağılıma uymadıkları sonucuna varılmıştır (tablo 4.10(A)). Bunun üzerine, normal dağılıma uyan gruplara Student T-testi, normal dağılıma uymayan gruplara ise Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Yapılan testlerde her iki gende de doku örneği grupları $p < 0.05$ bulunarak gruplar arasında istatistiksel bir farklılık gözlemlenirken (şekil 4.8), kan örneklerinde $p > 0.05$ değerleri, tanısal gruplar arasında ekspresyon farkı olmadığını göstermiştir. Yapılan T- testi sonuçları tablo 4.10 (B)'de, Mann-Whitney U testi sonuçları ise tablo 4.10 (C)'de verilmektedir.

Tablo 4.10: İnfertil hastaların hipospermatogenez ve sertoli cell only (SCO) tanılarına göre gruplandırılan doku ve kan örneklerinde gen ekspresyon farklılıklarının istatistiksel test sonuçları. (Tablo sonraki sayfada devam etmektedir)

Tests of Normality					
Tani		Shapiro-Wilk			
		Statistic	df	Sig.	
RNF8 Doku ΔCq	SCO	.932	11	.431	
	Hipospermatogenez	.919	22	.072	
RNF8 Kan ΔCq	SCO	.982	11	.977	
	Hipospermatogenez	.859	22	.005	
GTSF1 Doku ΔCq	SCO	.886	11	.124	
	Hipospermatogenez	.643	22	.000	
GTSF1 Kan ΔCq	SCO	.884	11	.116	
	Hipospermatogenez	.949	22	.307	

(A)

Ranks				
Tani		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RNF8 Kan ΔCq	SCO	11	17.82	196.00
	Hipospermatogenez	22	16.59	365.00
	Total	33		
GTSF1 Doku ΔCq	SCO	11	27.55	303.00
	Hipospermatogenez	22	11.73	258.00
	Total	33		

(B)

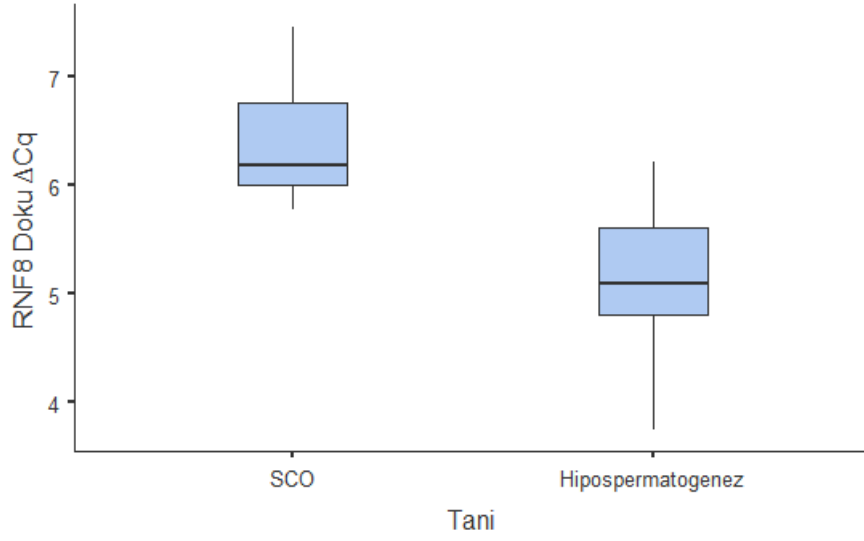
Test Statistics ^a		
	RNF8 Kan ΔCq	GTSF1 Doku ΔCq
Mann-Whitney U	112.000	5.000
Wilcoxon W	365.000	258.000
Z	-.344	-4.430
Asymp. Sig. (2-tailed)	.731	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.749 ^b	.000 ^b

(C)

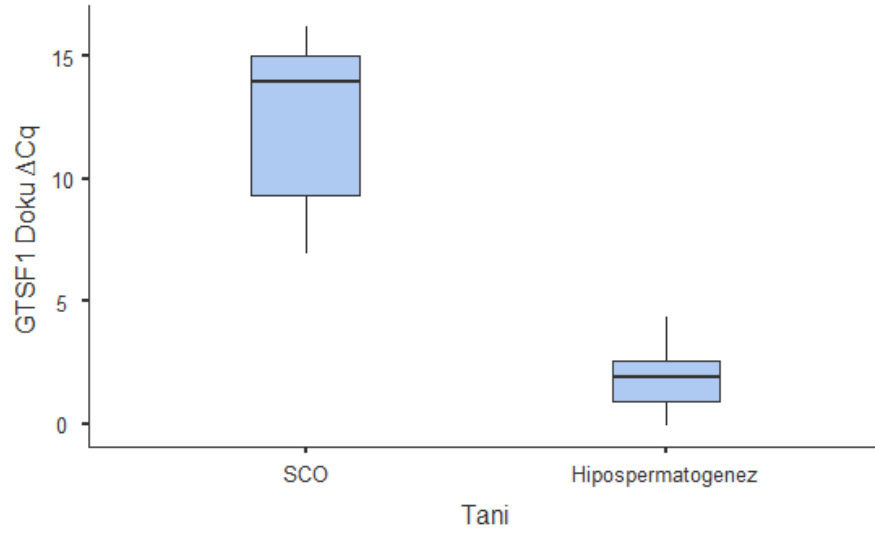
Group Statistics					
Tani		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
RNF8DCQdoku	SCO	11	6.4182	.54790	.16520
	Hipospermatogenez	22	5.3123	.92559	.19734
GTSFDCQkan	SCO	11	11.2873	1.03626	.31245
	Hipospermatogenez	22	11.2305	.86663	.18477

Independent Samples Test								
		t-test for Equality of Means						
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
							Lower	Upper
RNF8DCQdoku	Equal variances assumed	3.639	31	.001	1.10591	.30388	.48614	1.72568
	Equal variances not assumed	4.297	29.905	.000	1.10591	.25736	.58025	1.63157
GTSFDCQkan	Equal variances assumed	.166	31	.869	.05682	.34149	-.63965	.75329
	Equal variances not assumed	.157	17.214	.877	.05682	.36299	-.70829	.82193

RNF8 Doku ΔCq



GTSEF1 Doku ΔCq



Şekil 4.9: Yapılan istatistiksel testler sonucunda patolojik tanılarına göre gruplandırılan doku örneklerinin ΔCq değerleri arasındaki farklılıklar yukarıdaki grafiklerde gösterilmektedir.

İstatistiksel karşılaştırma testlerinin yanı sıra hasta ve kontrol gruplarının gen ekspresyonlarının upregüle veya downregüle olup olmadıklarının gözlemlenebilmesi için “ $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ” yani rölatif ekspresyon değerleri de hesaplanmıştır. Hesaplanan değerlerin gruplar içerisinde ortalamaları alınarak her grup için averaj rölatif ekspresyon değerleri hesaplanmıştır. Gruplara göre hesaplanan “ $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ” değerleri tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.11: Gruplara göre hesaplanan ortalama rölatif ekspresyon değerleri. (A) *RNF8* geni değerleri (B) *GTSF1* geni değerleri verilmiştir.

(A)

<i>RNF8</i> Geni	$2^{-\Delta\Delta Cq}$
İdiyopatik İnfertilite Doku	1.18
İdiyopatik İnfertilite Kan	1.18
İnfertil Kontrol Doku	1.31
İnfertil Kontrol Kan	1.37
Fertil Kontrol Kan	1.06
İdiyopatik İnfertilite Doku Hipospermatogenez	1.12
İnfertil Kontrol Doku Hipospermatogenez	1.31
İdiyopatik İnfertilite Doku SCO	1.03
İnfertil Kontrol Doku SCO	1.13
İdiyopatik İnfertilite Kan Hipospermatogenez	1.22
İnfertil Kontrol Kan Hipospermatogenez	1.54
İdiyopatik İnfertilite Kan SCO	1.11
İnfertil Kontrol Kan SCO	1.12

(B)

<i>GTSF1</i> Geni	$2^{-\Delta\Delta Cq}$
İdiyopatik İnfertilite Doku	12.88
İdiyopatik İnfertilite Kan	1.25
İnfertil Kontrol Doku	8.47
İnfertil Kontrol Kan	1.26
Fertil Kontrol Kan	1.11
İdiyopatik İnfertilite Doku Hipospermatogenez	1.96
İnfertil Kontrol Doku Hipospermatogenez	1.38
İdiyopatik İnfertilite Doku SCO	9.66
İnfertil Kontrol Doku SCO	3.45
İdiyopatik İnfertilite Kan Hipospermatogenez	1.24
İnfertil Kontrol Kan Hipospermatogenez	1.06
İdiyopatik İnfertilite Kan SCO	1.25
İnfertil Kontrol Kan SCO	1.06

5. TARTIŞMA

Son yıllarda gelişen moleküler ve genetik test yöntemleri ile birçok multifaktöriyel hastalığın genetik sebep ve altyapılarının anlaşılabilirliği büyük oranda artmıştır. Bu sayede binlerce genin birbirleri arasında olduğu kadar, klinik fenotiple olan ilişkilerin tanımlanması da mümkün olmuştur. Bu gelişmelere rağmen bazı kompleks hastalıklar henüz tam anlamıyla anlaşılabilmiş değildir. Erkek infertilitesi, bahsedildiği üzere genetik sebepleri ve altyapısında bulunan genotip - fenotip ilişkileri henüz tam olarak anlaşılabilen hastalıklar grubu içerisinde yer almaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda infertilitenin monogenik olarak ortaya çıkabildiği gibi kompleks gen etkileşimleri sonucunda da görülebildiği öne sürülmektedir (Cerván-Martín ve ark., 2020).

Bu tez projesi kapsamında; fonksiyonları ve etkileşimleri henüz kesin olarak bilinmeyen, fakat testis ve spermde doku spesifik yüksek ekspresyon gösterdiği bilinen bazı aday infertilite genlerinin idiyopatik infertil bireyler üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Bu proje planlanırken fertil olduğu bilinen erkek bireylerden alınacak kan örnekleri ile kontrol grubu oluşturulmuştur. Çalışma kapsamında 40 infertil bireyden TESE operasyonu ile testis doku ve kan örnekleri alınmıştır. Bu bireyler içerisinde infertilite sebebi bilinen ve bu neden ile çalışma kriterlerine uygun bulunmayan 9 hasta proje dışı bırakılmak yerine, kontrol grubu olarak projeye dahil edilmiştir. Bu bireylerde infertilite nedenleri bilindiği için, proje kapsamında incelenen hedef genlerde ekspresyon farklılığı beklenmediğinden bu hastaların testis dokuları, kontrol doku olarak önem kazanmıştır.

Proje başlangıçta sadece *STPG2* geni ekspresyon seviyelerinin araştırılması üzerine planlanmıştır. *STPG2*, azospermik bir hastada genin bulunduğu 4q22.3q23 bölgesinde 576,580 bp uzunluğunda bir mikrolezyon tespit edilmesi ve genin testiste ekspresyonunun olduğunun saptanması üzerine infertilitede aday gen olarak tanımlanmıştır (Yakut ve ark., 2013). Yeni yapılan bir çalışmada ise aday genlerde DNA sekanslama yöntemiyle *STPG2* geninde SNP mutasyon taraması yapılmış ve infertil

bireylerde kontrol bireylere oranla yaklaşık olarak %40 daha fazla *STPG2* geni SNP delesyon mutasyonu gözlemlendiği belirtilmiştir (Chan ve ark., 2023).

Literatürde *STPG2* geni üzerine, projemizde yapılması planlanan qRT-PCR yöntemi çalışması veya ekspresyon araştırması bulunmamaktadır. *STPG2* geni üzerine az da olsa DNA sekanslama araştırılması yapılmışken RNA ekspresyonu üzerine bir çalışma bulunmadığından ve ayrıca DNA sekanslama işlemleri için tez projesi kapsamında ayrılan bütçenin anlamlı bir sonuç elde edilebilecek sayıda örneğin çalışılmasına uygun olmayacağından *STPG2* geninin RNA ekspresyonunun qRT-PCR ile çalışılmasının daha uygun olacağı düşünülmüştür. Çalışma dahilinde *STPG2* geni için üç farklı primer çifti dizaynı yapılmış fakat primer optimizasyon çalışmaları sırasında denenen hiçbir protokolden başarılı sonuç alınamamıştır. Bu çalışmalarda başarılı sonuç elde edilememesi genin ekspresyon seviyesinin qRT-PCR yöntemiyle saptanamayacak kadar düşük olduğunu gösterebileceği gibi, genin belli yollar içerisinde aktive edilip genel olarak inaktif bir şekilde bulunuyor olabileceğini de düşündürmektedir.

Yapılan qRT-PCR çalışmaları istenilen sonucu vermeyince *STPG2* geninin testis dokusunda ekspresyonu olup olmadığına bakılması ve çalışmanın devamının getirilebilmesi açısından yeni aday genler saptanabilmesi için transkriptom (RNA dizileme) (RNA-seq) çalışmaları yapılmasına karar verilmiştir. Total RNAların analizinde kullanılan RNA-seq, kullanılan örnekte bulunan RNAların kuantifikasyonunu sağlayan yüksek verimli bir tarama yöntemidir (Deschamps-Francoeur ve ark., 2020). Bu yöntem; ribozomal RNAların uzaklaştırılması ile hedeflenen RNA moleküllerinin izole edilmesi, istenilen baz çifti sayısında fragmentler ile kütüphane oluşturulması ve bu fragmentlerin yeni nesil sekanslama (NGS) ile dizilenmesi adımlarından oluşmaktadır (Kukurba ve Montgomery, 2015). RNA-seq çalışmalarının çok adımlı ve yüksek maliyetli olması sebebi ile tüm dokular transkriptom çalışmasına dahil edilememiştir. Bu sebepten dolayı; infertilite sebebi bilinen 9 hastadan patolojik olarak 4'ü hipospermatogenez, 4'ü sertoli cell only sendromu tanısı almış olan toplam 8 kontrol doku ve aynı şekilde idiyopatik infertiliteye sahip 31 bireyden 4'ü hipospermatogenez, 4'ü sertoli cell only sendromu

tanısı almış olan toplam 8 hasta bireyden alınan doku örnekleri seçilerek transkriptom çalışması için toplam 16 bireyin total RNA örnekleri kullanılmıştır.

RNA dizileme çalışması sonucunda elde edilen sonuçlar, analizin daha sağlıklı sonuç vermesi açısından patolojik tanılarına göre gruplandırılarak sebebi belli olan ve idiyopatik infertil bireyler karşılaştırılmıştır. Hipospermatogenez tanılı olgular arasında yapılan istatistiksel testler sonucunda tüm genler için $p > 0.05$ olduğundan dokular arasında anlamlı bir ekspresyon farkı olmadığı kabul edilmiştir. SCO tanılı doku örnekleri arasında yapılan istatistiksel testlerde ise gruplar arasında bazı genlerde ekspresyon farkı olduğu gözlemlenmiştir. SCO tanılı dokularda *STPG2* geni üzerine yapılan incelemede p değeri 0.98 olması ve ekspresyon seviyesi farkını belirten “log2fold” (rölatif ekspresyon) değerinin 0.09 olması sebebiyle bu çalışmada *STPG2* geninde anlamlı bir ekspresyon farkı görülmediği sonucuna varılmıştır. SCO tanılı dokularda anlamlı ekspresyon farklılığı gösteren diğer genlerin belirlenebilmesi için p değerleri $p < 0.05$ olacak şekilde, log2fold değerleri ise > 0.5 (upregüle) veya < -0.5 (downregüle) olacak şekilde filtrelenmiştir. Filtreler sonucunda fark gösteren genlerin doku spesifik ekspresyon seviyeleri “GTEx” ve “The Protein Atlas” internet platformlarında incelenmiştir. Tez projesi kapsamında hem testis doku hem de kan örnekleri kullanıldığı için, qRT-PCR yöntemiyle sonuç elde edebilmek amacıyla seçilecek olan genlerin her iki dokuda da RNA ekspresyonlarının “GTEx” platformuna göre 1’den büyük olması şartı konulmuştur. Bu şartları sağlayan genler için literatür taraması yapılarak gen fonksiyonları ve erkek infertilitesiyle bağlantıları olup olmadığı belirlenmiştir. qRT-PCR’da hedef genlerin ekspresyonunun daha rahat gözlemlenebilmesi bakımından, tez projesi kapsamında incelenecek olan genlerin upregüle olarak (log2fold > 0.5) sonuç veren genler arasından seçilmesine karar verilmiştir. Analizler sonucunda projeye, belirtilen tüm şartları sağlayan ve literatürde erkek infertilitesi için aday gen olarak tanımlanan *GTSE1* ve *RNF8* genleri ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Projenin devamında *GTSE1* ve *RNF8* genleri için primer dizaynı yapılmış ve projeye dahil olan tüm doku ve kan örneklerinden ekspresyon analizi için qRT-PCR çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda, belirtildiği üzere 7 hastanın kan örnekleri hedef

genlerde analize katılabilecek şekilde sağlıklı sonuç vermemiştir. Proje dışı bırakılma kararı alınmadan önce bahsi geçen kan dokularının total RNA örneklerinden tekrardan cDNA eldesi yapılmış ve yeni elde edilen cDNA örnekleri ile qRT-PCR reaksiyonları tekrarlanmıştır. Buna rağmen bu örneklerden sağlıklı sonuç elde edilememiş olması, problemin total RNA örneklerinden kaynaklı olduğunu göstermektedir. Bu örneklerde yaşanan problemler total RNA izolasyonu sırasında düşük miktar veya saflıkta ürün elde edilmiş olmasından kaynaklı olabilir. Bunun sebebi izolasyon protokolünün işleyişi ya da kullanılan solüsyonların tazeliği ile ilgili olabileceği gibi kandaki hücre yoğunluğu ve pıhtılaşma oranları ile ilgili de olabilmektedir.

Yapılan qRT-PCR çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçların istatistiksel analizi farklılık gösterip göstermeyeceğini gözlemlemek için iki şekilde yapılmıştır. Biri cihazdan alınan işlenmemiş veriler yani “Cq” değerleri kullanılarak yapılırken ikinci analizler ise “ ΔCq ” değerleri kullanılarak yapılmıştır. Alınan sonuçlarda bazı gruplarda değişiklikler tespit edilmiştir. Cq değerleri ile yapılan analizlerde sağlıklı fertil kontrol grubundan alınan kan örnekleri ile infertil hasta bireylerden alınan kan örnekleri karşılaştırıldığında hem *GTSE1* hem de *RNF8* genlerinde ekspresyon farkı saptanırken, aynı testler ΔCq değerleri ile yapıldığında *GTSE1* geninde anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Buna benzer olarak; infertil bireylerden alınan doku örneklerinin ekspresyon seviyeleri patolojik tanılarına göre karşılaştırılırken Cq değerleri kullanıldığında sadece *GTSE1* geninde bir farklılık görülürken ΔCq değerleri ile istatistiksel analiz yapıldığı zaman hem *GTSE1* geninde hem de *RNF8* geninde gruplar arasında farklılık gözlemlenmiştir.

Yapılan istatistiksel testlerden daha sağlıklı çıkarımlar yapılabilmesi için ΔCq değerleri kullanılarak yapılan testlerin projenin belirleyici sonuçları olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Alınan bu kararın sebebi; yapılan qRT-PCR çalışmalarında kurulan reaksiyonlar arasında oluşabilecek eşit olmayan koşulları mümkün olduğunca elimine etmektir. Örneklerin ΔCq değerleri hedef genin Cq değeri ile aynı örneğe ait kontrol genin Cq değerlerinin farkını gösterdiği için istatistiksel analizlerde ΔCq değerlerini kullanmak; örneklerin başlangıç konsantrasyonlarındaki farklılıkların, master mix’lerde pipetaj hatası

ile oluşabilecek yoğunluk farklarının veya reaksiyonların analiz aşamasında eşik değerler arasında oluşabilecek değer farklılıklarının sonuçlar üzerinde fark yaratmasını engellenmektedir (Yuan ve ark., 2006).

Literatürde, yapılan çalışmalarda E3 ubikuitin ailesi üyesi olan *RNF8* geninin spermiyogenez aşamasında histon – protamin değişimlerinde rol oynayıp oynamadığı konusunda fikir ayrılıkları görülmektedir. Geçmiş yıllarda *RNF8* geninin farelerde spermatogenez üzerindeki etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada genin testis dokusunda H2A ve H2B histon ubikuitinasyonu üzerinden spermatogenez regülasyonunda etkili olduğu savunulmuştur. *RNF8* geni susturulmuş (*RNF8*-KO) fareler ile doğal fenotipe sahip farelerin karşılaştırıldığı çalışmada *RNF8*-KO farelerde spermiyogenez sırasında aksaklık olduğu, sperm sayısında azalma ve oluşan spermelerde yapısal bozukluklar gözlemlendiği saptanmış, *RNF8* geninin yokluğunun infertiliteye sebep olabileceği savunulmuştur (Lu ve ark., 2010). Son yıllarda yapılan bir çalışmada ise bu sonuçların yanlış olduğu ve *RNF8* geninin spermiyogenez sırasında histon – protamin değişikliğinde etkin olmadığı öne sürülmüştür. Yine doğal fenotip ile *RNF8*-KO farelerin karşılaştırıldığı bu çalışmada iki grup arasında ubikuitinasyonun ilk adımı olan H4K16 asetilasyonunda ve sperm üretim miktarında bir farklılık olmadığı immünohistokimyasal boyama ile gösterilmiştir (Abe ve ark., 2021).

İnsan testis dokuları üzerinde yapılan bir çalışmada ise infertil bireylerden alınan TESE örnekleri sperm pozitif ve sperm negatif olarak gruplandırılmıştır. qRT-PCR yöntemi ile gruplar arasındaki *RNF8* gen ekspresyonu karşılaştırıldığında ise sperm pozitif grupta *RNF8* gen ekspresyonunun belirgin bir şekilde arttığı gözlemlenerek, *RNF8* geninin sperm oluşumunda etkili bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği savunulmuştur (Nazari ve ark., 2019). Tez projesi kapsamında yapılan deneylerin sonucu bu bulguları desteklemektedir. Hipospermatogenez ve SCO tanılı bireylerde kanda anlamlı bir farklılık görünmese de doku örneklerinde hipospermatogenez tanılı infertil bireylerin *RNF8* geni ekspresyonunun SCO sendromu tanılı bireylere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra fertil kontrol ile infertil hasta bireylerin kan örneklerinde *RNF8* geni ekspresyonu

istatistiksel olarak karşılaştırıldığında infertil bireylerde ekspresyon seviyesinin daha düşük olduğu görülmektedir.

Sineklerden insanlara kadar, hayvanlar aleminde varlığının korunduğu gözlemlenen Gametocyte Specific Factor 1 (*GTSF1*) geni ekspresyonunun erkek farelerin yetişkin hayatları boyunca ekspresyonu olduğu ve en yüksek seviyesi geç spermatidlerde görülürken, epididimis spermatozoasında ekspresyonunun görülmediği belirtilmiştir. İnsanlarda hem erkek hem de kadınlarda ekspresyon gösteren *GTSF1* geninin sadece erkek fertilitesinde gerekli olduğu savunulmaktadır (Ipsaro ve ark., 2022). Yapılan diğer bir çalışmada kriptorşidizm hastalığı olan infertil bireylerde *GTSF1* gen ekspresyonunun düşük olduğu saptanmıştır (Hadziselimovic ve ark., 2015). Yakın zamanda transkriptom çalışmalarından düzenlenen bir makalede ise *GTSF1* geni ekspresyonunun nonobstruktif azospermi ve teratospermisi olan vakalarda, doğal fenotipe sahip fertil erkek bireylere kıyasla downregüle olduğu gözlemlenmiştir (Rochkenbach ve ark., 2023).

Tez projesi kapsamında yapılan qRT-PCR testlerinin sonuçları yukardaki literatür bilgileri ile uyumlu bulunmuştur. Elde edilen ΔCq değerleri ile yapılan istatistiksel değerlendirmelerde kan örnekleri arasında bir fark gözlemlenmese de hipospermatogenez ve SCO tanıli dokular arasında yapılan değerlendirmelerde sertoli cell only tanısı almış olan bireylerde *GTSF1* geni ekspresyonunun hipospermatogenez tanıli bireylere göre çok daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada elde edilen sonuçlar, *GTSF1* geninin sperm oluşumunda rol oynuyor olabileceği fikrini desteklemektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Gün geçtikçe büyüyen bir problem haline gelen infertilite vakalarının yarısını erkek infertilitesi oluşturmaktadır. Son yıllarda genetik alanında gelişim gösteren NGS yöntemleri sayesinde erkek üreme sistemi ile bağlantılı genlerin yanı sıra erkek infertilitesi ile ilişkilendirilebilecek binlerce gen saptanmıştır. Elde edilen bu bilgilere rağmen, bahsi geçen genlerin çoğunun henüz detaylı araştırmaları yapıp genetik bağlantıları ve protein fonksiyonları net olarak belirlenememiştir. Bu sebepten dolayı erkek infertilite vakalarının büyük bir kısmını (%30-60) altyapısal nedenleri henüz belirlenememiş olan idiyopatik infertilite oluşturmaktadır.

Bu tez projesinde asıl amaç, erkek infertilitesi ile bağlantılı olduğu düşünülen *STPG2* geninin fertil ve idiyopatik infertil bireyler arasında ekspresyon değişikliklerini qRT-PCR yöntemi kullanılarak göstermekti. *STPG2* geni için yapılan qRT-PCR çalışmalarından sonuç alınamayınca RNAseq çalışması yapılarak gen ekspresyonları karşılaştırıldıklarında hasta ve kontrol grubunda ekspresyon farklılığı gözlemlenmemiştir. Bunun üzerine, RNAseq çalışmalarında SCO tanısı almış, sebebi bilinen infertil ve idiyopatik infertil bireyler arasında ekspresyon farklılığı olduğu gözlemlenen *GTSF1* ve *RNF8* genleri için qRT-PCR deneyleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiklerinde; fertil ve infertil bireylerin kan örnekleri arasında *GTSF1* geninde ekspresyon farkı olmadığı ama *RNF8* geni ekspresyonunun infertil bireylere ait kan örneklerinde fertil bireylere göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Kontrol dokuları ile karşılaştırıldıklarında ise iki gende de gruplar arasında anlamlı bir ekspresyon farkı gözlemlenmemiştir. Patolojik tanılara göre hipospermatogenez ve SCO tanılı olgular karşılaştırıldığında ise iki gen için de kanda farklılık görülmezken, her iki gende doku örneklerinde SCO tanılı olguların testis doku örneklerinde hem *GTSF1* hem de *RNF8* gen ekspresyonlarının hipospermatogenez tanılı olguların testis doku örneklerine göre daha düşük oldukları belirlenmiştir. Sperm oluşumu olmayan SCO tanılı örneklerde gen ekspresyonlarının düşük olması, literatürde de belirtildiği gibi *GTSF1* ve *RNF8* genlerinin spermatogenezde etkin rol oynadıklarına işaret etmektedir.

qRT-PCR sonuçlarına ek olarak RNAseq çalışması sonuçları ve literatürde yapılan gen taramaları da göz önünde bulundurulduğunda, infertilite ve erkek üreme sisteminde etkin olan genlerin doku spesifik olarak çalışılmasının gen ekspresyon araştırmalarında daha doğru sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu proje kapsamında yapılan çalışmalarda; hem kan hem de doku ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gösteren *RNF8* geninin, infertilite vakalarında bir biyobelirteç olmaya aday olabileceği öngörülmüştür.

Bu tez projesinin en etkili limitasyonu TESE ameliyatının sadece infertil bireyler üzerinde uygulanmasından dolayı fertil bireylerden doku alınamamasıdır. Yine TESE ameliyatlarının çok sık yapılmıyor olması; kontrol olarak kullanılan, sebebi bilinen infertil olgulardan da az sayıda doku toplanabilmesine yol açmıştır. Proje süresinin kısıtlı olması nedeniyle daha fazla doku toplanamadığından, dokular patolojik olarak gruplandırılan dokularda eşit sayıda örneğe ulaşılamamıştır.

Projenin ilerleyen dönemlerinde yapılan RNAseq çalışmalarında sadece belirli sayıda testis doku örneği kullanılabilmiş olması, RNAseq sonuçlarının güvenilebilirliğini düşürmüştür. Bu çalışma sonucunda 35 bin'den fazla gen ile ilgili ekspresyon bilgisi elde edilmiş olmasına rağmen proje süresinin kısıtlı olmasından dolayı, projeye dahil edilecek genler çoğunlukla upregüle farklılık gösteren genler arasından taranmış ve tüm genler bireysel olarak incelenememiştir. Taranan genlerinin çoğunun testis spesifik ekspresyon gösterirken, kanda ekspresyonlarının olmaması da genlerin projeye dahil edilememesine sebep olmuştur.

İleriye yönelik bu konu üzerinde daha yüksek bütçelerle yapılabilecek RNAseq çalışmalarında özellikle sebebi bilinen infertil bireylerden daha çok kontrol dokusu toplanarak hem istatistiksel dağılımın daha iyi yapılabilmesi ve buna bağlı olarak daha doğru ve kesin sonuçların alınması sağlanabilecek hem de daha fazla genin ekspresyonu değerlendirilebilecektir. Bunun yanı sıra yapılacak ekspresyon çalışmalarının protein düzeyinde yapılacak çalışmalar ile de desteklenmesini önermekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abe H, Meduri R, Li Z, Andreassen PR, Namekawa SH. RNF8 is not required for histone-to-protamine exchange in spermiogenesis†. *Biol Reprod.* 2021; 15;105(5):1154-1159.
- Adrião M, Ferreira S, Silva RS, Garcia M, Dória S, Costa C, Castro-Correia C, Fontoura M. 46,XX male disorder of sexual development. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2020;29(1):43-45.
- Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho CL, Henkel R, Vij S, Arafa M, Panner Selvam MK, Shah R. Male infertility. *Lancet.* 2021; 23;397(10271):319-333.
- Akdere H., Burgazlı M., Erkek İnfertilitesine Genetik Yaklaşım (Derleme). 2013; 15(54): 207-211
- Allen K, Wise N, Frangos E, Komisaruk B. Male Urogenital System Mapped Onto the Sensory Cortex: Functional Magnetic Resonance Imaging Evidence. *J Sex Med.* 2020;17(4):603-613.
- Arif A., Bailey S., Izumi N., Anzelon T. A., Ozata D. M., Andersson C., Gainetdinov I., MacRae I. J., Tomari Y., Zamore P. D. The conserved zinc-finger protein GTSF1 helps PIWI proteins achieve their full catalytic potential. *bioRxiv* 2021.05.04.442675
- Ben Khelifa M, Coutton C, Zouari R, Karaouzène T, Rendu J, Bidart M, Yassine S, Pierre V, Delaroche J, Hennebicq S, Grunwald D, Escalier D, Pernet-Gallay K, Jouk PS, Thierry-Mieg N, Touré A, Arnoult C, Ray PF. Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Am J Hum Genet.* 2014; 2;94(1):95-104.
- Biason-Lauber A. The Battle of the Sexes: Human Sex Development and Its Disorders. *Results Probl Cell Differ.* 2016;58:337-82.
- Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "spermatogenesis". *Encyclopedia Britannica*, 21 Dec. 2023, <https://www.britannica.com/science/spermatogenesis>. Accessed 6 February 2024

Cannarella R, Condorelli RA, Mongioì LM, La Vignera S, Calogero AE. Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility. *Int J Mol Sci.* 2020;3;21(5):1728.

Cerván-Martín M, Castilla JA, Palomino-Morales RJ, Carmona FD. Genetic Landscape of Nonobstructive Azoospermia and New Perspectives for the Clinic. *J Clin Med.* 2020; 21;9(2):300.

Chan CC, Yen TH, Tseng HC, Mai B, Ho PK, Chou JL, Wu GJ, Huang YC. A Comprehensive Genetic Study of Microtubule-Associated Gene Clusters for Male Infertility in a Taiwanese Cohort. *Int J Mol Sci.* 2023;19;24(20):15363.

Chen H, Alves MBR, Belleannée C. Contribution of epididymal epithelial cell functions to sperm epigenetic changes and the health of progeny. *Hum Reprod Update.* 2021;21;28(1):51-66.

Cheng X, DeGiorgio M. Flexible Mixture Model Approaches That Accommodate Footprint Size Variability for Robust Detection of Balancing Selection. *Mol Biol Evol.* 2020; 1;37(11):3267-3291.

Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, Szczesniak MW, Gaffney DJ, Elo LL, Zhang X, Mortazavi A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* 2016; 26;17:13.

Connolly S, Anney R, Gallagher L, Heron EA. A genome-wide investigation into parent-of-origin effects in autism spectrum disorder identifies previously associated genes including SHANK3. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(2):234-239.

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* 2010;16(3):231-45.

Deschamps-Francoeur G, Simoneau J, Scott MS. Handling multi-mapped reads in RNA-seq. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020; 12;18:1569-1576.

Docampo MJ, Hadziselimovic F. Molecular Pathology of Cryptorchidism-Induced Infertility. *Sex Dev.* 2015;9(5):269-78.

Eisenberg ML, Esteves SC, Lamb DJ, Hotaling JM, Giwercman A, Hwang K, Cheng YS. Male infertility. *Nat Rev Dis Primers.* 2023; 14;9(1):49.

Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol Reprod.* 2017; 1;96(1):2-12.

Genetic basis of idiopathic male infertility. Granada Üniversitesi, Doktora Tezi, 2022, Granada. (Danışman: Francisco David Carmona López, Rogelio Jesús Palomino Morales)

Ghanbari E, Khazaei M, Ghahremani-Nasab M, Mehdizadeh A, Yousefi M. Novel therapeutic approaches of tissue engineering in male infertility. *Cell Tissue Res.* 2020;380(1):31-42.

Grande, G., Foresta, C. Male Reproduction: From Pathophysiology to Clinical Assessment. In: Bettocchi, C., Busetto, G.M., Carrieri, G., Cormio, L. (eds) *Practical Clinical Andrology*. Springer, Cham. 2023, p 161–172.

Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev.* 2016;96(1):1-17.

Gunes S, Esteves SC. Role of genetics and epigenetics in male infertility. *Andrologia.* 2021;53(1):e13586.

Guo Y, Song Y, Guo Z, Hu M, Liu B, Duan H, Wang L, Yuan T, Wang D. Function of RAD6B and RNF8 in spermatogenesis. *Cell Cycle.* 2018;17(2):162-173.

Gurung P, Yetiskul E, Jialal I. Physiology, Male Reproductive System. In: *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls* 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538429/>

He H, Yu F, Shen W, Chen K, Zhang L, Lou S, Zhang Q, Chen S, Yuan X, Jia X, Zhou Y. The Novel Key Genes of Non-obstructive Azoospermia Affect Spermatogenesis: Transcriptomic Analysis Based on RNA-Seq and scRNA-Seq Data. *Front Genet.* 2021;26:12:608629.

Himmelreich Perić M, Takahashi M, Ježek D, Cunha GR. Early development of the human embryonic testis. *Differentiation.* 2023;129:4-16.

Hodžić A, Maver A, Zorn B, Petrović D, Kunej T, Peterlin B. Transcriptomic signatures for human male infertility. *Front Mol Biosci.* 2023; 21;10:1226829.

Hood RL, Schenkel LC, Nikkel SM, Ainsworth PJ, Pare G, Boycott KM, Bulman DE, Sadikovic B. The defining DNA methylation signature of Floating-Harbor Syndrome. *Sci Rep.* 2016; 9;6:38803.

Hrdlickova R, Toloue M, Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017;8(1):10.1002/wrna.1364.

<https://www.kaanaydos.com.tr/sperm-mitokondri-hastaliklari-ve-tedavisi.html> 3 Ocak 2017, Erişim: 06.02.2024

Huntriss J, Lu J, Hemmings K, Bayne R, Anderson R, Rutherford A, Balen A, Elder K, Picton HM. Isolation and expression of the human gametocyte-specific factor 1 gene (GTSF1) in fetal ovary, oocytes, and preimplantation embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2017;34(1):23-31.

Ipsaro JJ, Joshua-Tor L. Developmental roles and molecular mechanisms of Asterix/GTSF1. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2022;13(5):e1716.

Joshi M, Rajender S. Long non-coding RNAs (lncRNAs) in spermatogenesis and male infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020; 30;18(1):103.

Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C; European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol*. 2012;62(2):324-32.

Jungwirth A., Diemer T., Kopa Z., Krausz C., Minhas S., Tournaye H. European Association of Urology guidelines on Male Infertility. 2019

Kartlaşmış K., Kokbas U., Kayrin L. PIWI-Etkileşimli RNA'ların Biyogenezi ve İşlevleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2018; 27. 18-26.

Kaur G, Thompson LA, Dufour JM. Sertoli cells--immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;30:36-44.

Kavarthapu R, Anbazhagan R, Sharma AK, Shiloach J, Dufau ML. Linking Phospho-Gonadotropin Regulated Testicular RNA Helicase (GRTH/DDX25) to Histone Ubiquitination and Acetylation Essential for Spermatid Development During Spermiogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 15;8:310.

Kızılay F., Altay B., Spermatogenez, spermiyogenezis ve klinik yansımaları. *Androl Bul* 2019;21:177–184

Kukurba KR, Montgomery SB. RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc*. 2015; 13;2015(11):951-69.

Kuroda S, Usui K, Sanjo H, Takeshima T, Kawahara T, Uemura H, Yumura Y. Genetic disorders and male infertility. *Reprod Med Biol*. 2020;27;19(4):314-322.

Law NC, Oatley MJ, Oatley JM. Developmental kinetics and transcriptome dynamics of stem cell specification in the spermatogenic lineage. *Nat Commun*. 2019; 26;10(1):2787.

Liao J, Ng SH, Luk AC, Suen HC, Qian Y, Lee AWT, Tu J, Fung JCL, Tang NLS, Feng B, Chan WY, Fouchet P, Hobbs RM, Lee TL. Revealing cellular and molecular transitions in neonatal germ cell differentiation using single cell RNA sequencing. *Development*. 2019; 27;146(6):dev174953.

Lotti F, Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. *Hum Reprod Update*. 2015;21(1):56-83.

Lu LY, Wu J, Ye L, Gavrilina GB, Saunders TL, Yu X. RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev Cell*. 2010;16;18(3):371-84.

Lukkani LK, Naorem LD, Muthaiyan M, Venkatesan A. Identification of potential key genes related to idiopathic male infertility using RNA-sequencing data: an *in-silico* approach. *Hum Fertil (Camb)*. 2023;26(5):1149-1163.

Lutz SM, Cho MH, Young K, Hersh CP, Castaldi PJ, McDonald ML, Regan E, Mattheisen M, DeMeo DL, Parker M, Foreman M, Make BJ, Jensen RL, Casaburi R, Lomas DA, Bhatt SP, Bakke P, Gulsvik A, Crapo JD, Beaty TH, Laird NM, Lange C, Hokanson JE, Silverman EK; ECLIPSE Investigators; COPDGene Investigators. A genome-wide association study identifies risk loci for spirometric measures among smokers of European and African ancestry. *BMC Genet*. 2015; 3;16:138.

Ma T, Keller JA, Yu X. RNF8-dependent histone ubiquitination during DNA damage response and spermatogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2011;43(5):339-45.

Mäkelä JA, Hobbs RM. Molecular regulation of spermatogonial stem cell renewal and differentiation. *Reproduction*. 2019;158(5):R169-R187.

Mäkelä JA, Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testis Development. *Endocr Rev*. 2019; 1;40(4):857-905.

Mamuna N., Mehnaz K. Classification, causes, diagnosis and treatment of male infertility: a review. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. (2017). 17. 89-109.

Mawhinney M, Mariotti A. Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. *Periodontol 2000*. 2013;61(1):232-51.

Ménézo YJ, Veiga A, Pouly JL. Assisted reproductive technology (ART) in humans: facts and uncertainties. *Theriogenology*. 2000 ;15;53(2):599-610.

Mostafa T, Abdel-Hamid I, Taymour M, Ali O. Genetic variants in varicocele-related male infertility: a systematic review and future directions. *Hum Fertil (Camb)*. 2023;26(3):632-648.

Nazari M, Babakhanzadeh E, Mohsen Aghaei Zarch S, Talebi M, Narimani N, Dargahi M, Sabbaghian M, Ghasemi N. Upregulation of the RNF8 gene can predict the presence of sperm in azoospermic individuals. *Clin Exp Reprod Med*. 2020;47(1):61-67.

Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Genetics of Male Infertility. *Curr Urol Rep*. 2016;17(10):70.

Njagi P, Groot W, Arsenijevic J, Dyer S, Mburu G, Kiarie J. Financial costs of assisted reproductive technology for patients in low- and middle-income countries: a systematic review. *Hum Reprod Open*. 2023; 1;2023(2):hoad007.

Nowaczyk MJM, Nikkel SM, White SM. Floating-Harbor Syndrome. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. *GeneReviews®* 2012;29 [Updated 2022 Oct 20]. [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2024.

Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008;24:263-86.

Orhan D. Testis Biopsilerinde İnfertilite Değerlendirmesi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi 2012, <https://www.kaanaydos.com.tr/testis-biopsilerinde-infertilite-degerlendirilmesi.html>

Pask A. The Reproductive System. *Adv Exp Med Biol*. 2016;886:1-12.

Picut CA, Ziejewski MK, Stanislaus D. Comparative Aspects of Pre- and Postnatal Development of the Male Reproductive System. *Birth Defects Res*. 2018; 15;110(3):190-227.

Robertson MJ, Kent K, Tharp N, Nozawa K, Dean L, Mathew M, Grimm SL, Yu Z, Légaré C, Fujihara Y, Ikawa M, Sullivan R, Coarfa C, Matzuk MM, Garcia TX. Large-scale discovery of male reproductive tract-specific genes through analysis of RNA-seq datasets. *BMC Biol.* 2020.,19;18(1):103.

Rockenbach MK, Fraga LR, Kowalski TW, Sanseverino MTV. Expression profiles of meiotic genes in male vs. female gonads and gametes: Insights into fertility issues. *Front Genet.* 2023; 14;14:1125097.

Rotondo JC, Lanzillotti C, Mazziotta C, Tognon M, Martini F. Epigenetics of Male Infertility: The Role of DNA Methylation. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 22;9:689624.

Rowe P. J., Comhaire F. H., Hargreave T. B., Mahmoud A. M. A. WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. 2000 ISBN: 9780521774741

Ruiz-Villalba A, Ruijter JM, van den Hoff MJB. Use and Misuse of Cq in qPCR Data Analysis and Reporting. *Life (Basel).* 2021;29;11(6):496.

Scribner RT, Tadros NN. Anatomy and Physiology of the Male Reproductive System. In: Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC, eds. *Manual of Sperm Retrieval and Preparation in Human Assisted Reproduction.* Cambridge University Press; 2021:1-8.

Selvaraju S, Ramya L, Parthipan S, Swathi D, Binsila BK, Kolte AP. Deciphering the complexity of sperm transcriptome reveals genes governing functional membrane and acrosome integrities potentially influence fertility. *Cell Tissue Res.* 2021;385(1):207-222.

Sin HS, Barski A, Zhang F, Kartashov AV, Nussenzweig A, Chen J, Andreassen PR, Namekawa SH. RNF8 regulates active epigenetic modifications and escape gene activation from inactive sex chromosomes in post-meiotic spermatids. *Genes Dev.* 2012; 15;26(24):2737-48.

Sudhakar DVS, Shah R, Gajbhiye RK. Genetics of Male Infertility - Present and Future: A Narrative Review. *J Hum Reprod Sci.* 2021;14(3):217-227.

Sullivan R, Saez F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction*. 2013; 14;146(1):R21-35.

Takemoto N, Yoshimura T, Miyazaki S, Tashiro F, Miyazaki J. Gtsf1l and Gtsf2 Are Specifically Expressed in Gonocytes and Spermatids but Are Not Essential for Spermatogenesis. *PLoS One*. 2016; 1;11(3):e0150390.

Tan K, Song HW, Wilkinson MF. Single-cell RNAseq analysis of testicular germ and somatic cell development during the perinatal period. *Development*. 2020; 3;147(3):dev183251.

Tanh T. N., Van P. D., Cong T. D., Minh T. L., Vu Q. H. N. Assessment of testis histopathological changes and spermatogenesis in male mice exposed to chronic scrotal heat stress. *J Anim Behav Biometeorol* 2020; 8:174-180

Tüttelmann F, Simoni M, Kliesch S, Ledig S, Dworniczak B, Wieacker P, Röpke A. Copy number variants in patients with severe oligozoospermia and Sertoli-cell-only syndrome. *PLoS One*. 2011; 29;6(4):e19426.

Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Pontén F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015; 23;347(6220):1260419.

Ünal M. S., Özer M. Nonobstrüktif Azospermi Olgularında Yeni Yaklaşımlar. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 2019; 26(1): 111-116.

Van den Berge K., Hembach K., Soneson C., Tiberi S., Clement L., Love M., Patro R., Robinson M. RNA sequencing data: hitchhiker's guide to expression analysis. 2019; 2:139–73

Von Schalburg K. R., Rondeau E. B., Leong J. S., Davidson W. S., Koop B. F. Regulatory processes that control haploid expression of salmon sperm mRNAs. BMC Res Notes. 2018; 3;11(1):639.

Wu J, Huen MS, Lu LY, Ye L, Dou Y, Ljungman M, Chen J, Yu X. Histone ubiquitination associates with BRCA1-dependent DNA damage response. Mol Cell Biol. 2009;29(3):849-60.

Wu WJ, Gitlin JS. The Male Genital System. Pediatr Rev. 2020; 41(3):101-111.

Wu X, Zhou L, Shi J, Cheng CY, Sun F. Multiomics analysis of male infertility†. Biol Reprod. 2022; 25;107(1):118-134.

Xiong Y, Yu C, Zhang Q. Ubiquitin-Proteasome System-Regulated Protein Degradation in Spermatogenesis. Cells. 2022; 21;11(6):1058.

Yakut S, Cetin Z, Clark OA, Usta MF, Berker S, Luleci G. Exceptional complex chromosomal rearrangement and microdeletions at the 4q22.3q23 and 14q31.1q31.3 regions in a patient with azoospermia. Gene. 2013; 1;512(1):157-60.

Yan J, Jetten AM. RAP80 and RNF8, key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites. Cancer Lett. 2008; 28;271(2):179-90.

Yoshimura T, Toyoda S, Kuramochi-Miyagawa S, Miyazaki T, Miyazaki S, Tashiro F, Yamato E, Nakano T, Miyazaki J. Gtsf1/Cue110, a gene encoding a protein with two copies of a CHHC Zn-finger motif, is involved in spermatogenesis and retrotransposon suppression in murine testes. Dev Biol. 2009;1;335(1):216-27.

Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics. 2006; 22;7:85.

EK 1 - ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Katılımcı / Gönüllünün Protokol Numarası:

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

- a. Araştırmanın Adı: “Erkek infertilitesi ve STPG2 geni ekspresyonu arasındaki bağlantının araştırılması”
- b. Araştırmanın İçeriği: İnfertil erkeklerde kan ve testis biyopsi materyalinden RNA izolasyonu yapılarak RT-PCR yöntemiyle STPG2 geni ekspresyon seviyelerinin araştırılması.
- c. Araştırmanın Amacı: Erkek infertilitesinde aday gen olarak gösterilen STPG2 geninin ekspresyon seviyelerinin infertil bireylerde farklılık gösterip göstermediğinin araştırılması. Bu araştırma sonucunda erkek infertilitesinde bilinmeyen faktörlerin anlaşılmasına ve olası tedavi yöntemleri geliştirilmesine katkı sağlamak amaçlanmaktadır.
- d. Araştırmanın Nedeni: Tez çalışması
- e. Araştırmanın Öngörülen Süresi: 1 yıl
- f. Araştırmaya Katılması Beklenen Katılımcı/Gönüllü Sayısı: 30 (otuz)
- g. Araştırmada İzlenecek Deneysel İşlemler:
 - o Projeye katılmayı kabul eden infertil erkek hastalardan imzalı onam formu ile izin alınması.
 - o Hastalardan kan ve testis biyopsisi örnekleri alınması.
 - o Kandan ve dokudan RNA izolasyonu yapılması.
 - o Total RNA’dan cDNA eldesi.
 - o Elde edilen cDNA’dan STPG2 geninin ve housekeeping gen olarak da GAPDH geninin Real – Time PCR ile ekspresyon analizinin yapılması.
 - o Kan ve testis biyopsi örneklerinden elde edilen ekspresyon profillerinin karşılaştırılarak bioinformatik olarak değerlendirilmesi.

2. Gönüllünün/Katılımcının Uygulama Sırasında Karşılaşabileceği Riskler ve Rahatsızlıklar:

Araştırmada kullanılacak örnekler, infertilite tanısı koyulan hastalardan rutin muayenede alınan kan ve sperm yoğunluğu gözlemi için alınan testis biyopsi materyali örnekleri olacaktır. Katılımcılar, tanı testlerinin dışında araştırma kapsamında ekstra bir işleme tabi tutulmayacaklardır. Testis biyopsisinin olası yan etkileri; operasyon bölgesinde ağrı, kanama, işlem sonrası enfeksiyon ve testiküler yetersizlik olarak belirtilmektedir. Kan örneği alımı hastalar açısından herhangi bir risk taşımamaktadır.

Yukarıda açıklanan araştırma sırasında uygulanacak olan işlemlerin bana aşağıda belirtilen riskleri ve rahatsızlıkları getirebileceğinin bilincindeyim:

Operasyon bölgesinde ağrı, kanama, işlem sonrası enfeksiyon ve testiküler yetersizlik

3. Gönüllüler/Katılımcılar İçin Araştırmadan Beklenen Yarar:

Araştırma sonucunda elde edilen sonuçların dünya çapında infertilite üzerinde çalışan bilim insanlarının erkek infertilitesinde tanı, tedavi, genital gelişim ve vücuttaki moleküler düzeyde işleyiş üzerine yapılan çalışmalarına katkıda bulunması umulmaktadır. Bunlara ek olarak ise yapılan araştırma sonucunda erkek infertilitesinde yapılan rutin tanı testlerinin genişletilmesi ve infertilite sebeplerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak tedavi yöntemleri geliştirilmesine de katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

4. Araştırma Konusundaki Soruların Cevaplandırılması:

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile haklarım konusunda bilgi almak için aşağıda belirtilen kişiyle bağlantı kurmam yeterli olacaktır.

Adı- Soyadı: Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM Telefon: +90 242 249 69 70

5. Zararların Karşılanması:

Bu çalışmaya katıldığım için zarar göreceğim olursam, gerekli olan tıbbi bakımın sorumlu araştırmacı tarafından yerine getirileceği, uygulanan işleme bağlı olarak gelişebilecek her tür hasara (sakatlanma ve ölüm dahil) karşı güvencede olduğum, masraflarımın Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜMtarafından karşılanacağı bana bildirildi.

6. Araştırma Giderleri:

Araştırma kapsamındaki bütün işlemler için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

7. Gönüllülük, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma:

- a. Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.
 - b. Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.
 - c. Sorumlu araştırmacıya haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.
8. Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle ya da araştırma prosedürüne bağlı olarak onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

9. Gizlilik:

Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

10. Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye / katılımcıya verilmesi gereken bilgileri gösteren Aydınlatılmış Onam Formu adlı metni kendi anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım. Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün / katılımcının Adı- Soyadı:

Yaş ve Cinsiyeti:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....
.....

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....
.....

Tarih:

Açıklamaları Yapan Araştırmacının Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Onam alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı- Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gizem	Uyruğu
Soyadı	Azizoğlu	Tel no
Doğum tarihi		e-posta

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise		
Lisans		
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
--------	-------	----------------

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
-----------------	------------	-------

Proje Deneyimi

Proje Adı

Destekleyen kurum

Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler:

