

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ**

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**SEBEBİ AÇIKLANAMAYAN ERKEK İNFERTİLİTESİNİN  
AÇIKLANMASINA TÜM EKZOM ANALİZLERİNİN  
KATKISI**

**DR. HAMDİ KALE  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN: PROF. DR. SEHER BAŞARAN**

**İSTANBUL-2021**

**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, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Hamdi Kale

## İTHAF

“Kimin karısı ve çocuğu yoksa neşesi yoktur”

Sümer Atasözü



Sümerlerde Yaradılış Mitosu. M.Ö. ~2000, Nippur, Mezopotamya

## TEŞEKKÜR

Tez sürecim boyunca akademik katkıları ve yorumlarıyla daima ufkumu genişleten ve tüm zorlukları kolaylaştırmak için çabasını esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız, tez danışmanım ve saygıdeğer hocam Prof. Dr. Seher Başaran'a,

Uzmanlık eğitimim ve tez sürecim boyunca koşulsuz desteği için kıymetli hocam Prof. Dr. Birsen Karaman'a,

Güncel bilgilere hakimiyeti, bilimselliği ve bilgilerini bizimle paylaşma çabasıyla hatırlayacağım sevgili hocam Prof. Dr. Oya Uyguner'e

Asistanlığım boyunca kendilerinden çok şey öğrendiğim ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Uzm. Dr. Umut Altunoğlu, Uzm. Dr. Şahin Avcı ve Uzm. Dr. Tuğba Kalaycı ile İTF Tıbbi Genetik Laboratuvar ve Poliklinikteki tüm değerli çalışma arkadaşlarıma,

Tez çalışmama yaptıkları değerli katkılarından dolayı Uz. Dr. Uğur Gümüş'e, Uzm. Dr. Bahtiyar Mammadov'a, Uzm. Dr. Abdullah İhsan Gürler'e,

Hayatım boyunca cömertçe yaptıkları sayısız fedakarlık ve iyimserlikleri için sonsuz güç ve ilham kaynağı olan aileme,

Tüm kalbimle teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                 |      |
|---------------------------------------------------------------------------------|------|
| TEZ ONAYI .....                                                                 | İİ   |
| BEYAN.....                                                                      | İİİ  |
| İTHAF.....                                                                      | İV   |
| TEŞEKKÜR.....                                                                   | V    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                               | VI   |
| TABLolar LİSTESİ.....                                                           | İX   |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                          | Xİİ  |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....                                           | Xİİİ |
| ÖZET .....                                                                      | XV   |
| ABSTRACT.....                                                                   | XVİ  |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                                           | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                         | 3    |
| 2.1. Tarihçe .....                                                              | 3    |
| 2.2. Erkek Üreme Sistemi .....                                                  | 6    |
| 2.2.1. Erkek Genital Sisteminin Embriyonik Gelişimi .....                       | 6    |
| 2.2.2. Hipotalamus, Hipofiz ve Testis Arasındaki İlişki.....                    | 7    |
| 2.2.3. Spermatogenez .....                                                      | 7    |
| 2.3. Gebeliğin Oluşumu .....                                                    | 10   |
| 2.4. İnfertilite .....                                                          | 11   |
| 2.4.1. İnfertilite Sebepleri .....                                              | 11   |
| 2.4.1.1. Kadın İnfertilitesi .....                                              | 11   |
| 2.4.1.2. Erkeklerde İnfertilite .....                                           | 12   |
| 2.4.2. Spermiyogram Analizi .....                                               | 14   |
| 2.5. Y Kromozomu ve Yapısı .....                                                | 15   |
| 2.5.1. SRY (Sex Region of Y) geni-Testis belirleyici faktör ( <i>TDF</i> )..... | 15   |
| 2.5.2. Y Mikrodelesyonları .....                                                | 16   |
| 2.6. İnfertil Erkek Hastanın Değerlendirilmesi.....                             | 19   |
| 2.7. İnfertilite Etiolojisinde Genetik Faktörler.....                           | 19   |
| 2.7.1. Kromozom Sayı Anomalileri .....                                          | 20   |
| 2.7.2. Kromozom Yapı Anomalileri .....                                          | 21   |

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.7.3. İnfertilite İlişkili Tek Gen Mutasyonları .....                                                     | 23 |
| 2.8. İnfertilitenin Araştırılmasında Kullanılan Sitogenetik ve Moleküler Genetik Analiz Yöntemleri .....   | 24 |
| 2.8.1. Karyotip Analizi.....                                                                               | 24 |
| 2.8.2. Y Mikrodelesyon Analizi.....                                                                        | 25 |
| 2.8.3. Moleküler Genetik Analiz Yöntemleri .....                                                           | 25 |
| 2.8.3.1. Sanger Dizileme Yöntemi .....                                                                     | 25 |
| 2.8.3.2. Yeni Nesil Dizileme .....                                                                         | 26 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                                                    | 31 |
| 3.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması.....                                                                   | 31 |
| 3.2. Klinik Değerlendirmeler .....                                                                         | 31 |
| 3.3. Kromozom Analizleri .....                                                                             | 31 |
| 3.4. Moleküler Çalışmalar.....                                                                             | 32 |
| 3.5. Biyoinformatik Varyant Analizi .....                                                                  | 45 |
| 3.5.1. Varyant Patojenitesinin Belirlenmesi.....                                                           | 45 |
| 3.6. Primer Tasarımı .....                                                                                 | 46 |
| 3.7. Ekzonik Bölgelerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile Çoğaltılması ve Saflaştırılması..... | 47 |
| 3.8. Sanger Dizi Analizi ile Varyantın İncelenmesi ve Biyoinformatik Analizi .....                         | 49 |
| 3.8.1. Dizi PCR Çalışması .....                                                                            | 49 |
| 3.8.2. Kapiller Elektroferez.....                                                                          | 50 |
| 3.8.3. Dizileme Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Biyoinformatik Analizi .....                             | 50 |
| 4. BULGULAR.....                                                                                           | 51 |
| 4.1. Olgu 1.....                                                                                           | 51 |
| 4.2. Olgu 2.....                                                                                           | 54 |
| 4.3. Olgu 3.....                                                                                           | 55 |
| 4.4. Olgu 4.....                                                                                           | 58 |
| 4.5. Olgu 5.....                                                                                           | 60 |
| 4.6. Olgu 6.....                                                                                           | 62 |
| 4.7. Olgu 7.....                                                                                           | 65 |
| 4.8. Olgu 8.....                                                                                           | 67 |
| 4.9. Olgu 9.....                                                                                           | 70 |
| 4.10. Olgu 10.....                                                                                         | 72 |

|                                                       |     |
|-------------------------------------------------------|-----|
| 5. TARTIŞMA .....                                     | 77  |
| 5.1. Moleküler Analiz Sonuçlarının Yorumlanması ..... | 78  |
| KAYNAKLAR .....                                       | 91  |
| ETİK KURUL KARARI .....                               | 107 |
| FORMLAR .....                                         | 108 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                        | 112 |



## TABLOLAR LİSTESİ

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1. Karşılaştırmalı Spermiyogram Kriterleri.....                                     | 14 |
| Tablo 2. ACMG Varyant Patojenite Kriterleri .....                                         | 28 |
| Tablo 3. ACMG Varyant Benign Kriterleri.....                                              | 29 |
| Tablo 4. Varyantların sınıflandırılmasında kullanılan kriterlerin değerlendirilmesi ..... | 30 |
| Tablo 5. PZR kondüsyonları .....                                                          | 33 |
| Tablo 6. Olgulardan ve Eşlerden Elde Edilen DNA Konsantrasyonları.....                    | 34 |
| Tablo 7. Enzimatik Fragmentasyon Mixi .....                                               | 35 |
| Tablo 8. Enzimatik Fragmentasyon Mixi.....                                                | 35 |
| Tablo 9. Ligasyon Mixi .....                                                              | 36 |
| Tablo 10. PCR Mixi Miktarları.....                                                        | 37 |
| Tablo 11. PCR Programı.....                                                               | 37 |
| Tablo 12. Hibridizasyon Reaksiyonu için Miktarlar .....                                   | 38 |
| Tablo 13. İnkübe Koşulları .....                                                          | 39 |
| Tablo 14. Termal Cyclers Koşulları .....                                                  | 40 |
| Tablo 15. Mix Hacimleri .....                                                             | 40 |
| Tablo 16. Sirkülerizasyon Mixi Miktarları .....                                           | 41 |
| Tablo 17. Cyclers Programı.....                                                           | 41 |
| Tablo 18. Digestiyon Mixi.....                                                            | 42 |
| Tablo 19. Termal Cyclers Programı .....                                                   | 42 |
| Tablo 20. DNB Reaksiyonu Mix-1 Miktarları.....                                            | 43 |
| Tablo 21. Termal Cyclers Programı .....                                                   | 43 |
| Tablo 22. DNB Reaksiyon Mix-2 Miktarları.....                                             | 43 |
| Tablo 23. Termal Cyclers Programı .....                                                   | 44 |
| Tablo 24. Componentler .....                                                              | 44 |
| Tablo 25. Varyantların Fenotipe Olası Etkileri Açısından Sınıflandırma Kriterleri .....   | 46 |
| Tablo 26. Primer Dizileri .....                                                           | 47 |
| Tablo 27. PZR Çalışması için Kullanılan Malzemeler ve Final Konsantrasyonları.....        | 48 |
| Tablo 28. PZR Çalışma Koşulları.....                                                      | 48 |
| Tablo 29. Dizi PZR Çalışması için Kullanılan Malzemeler .....                             | 49 |
| Tablo 30. Dizi PZR Çalışma Protokolü .....                                                | 49 |

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 31. Kapiller Elektroforez Yürütme Koşulları .....                                                                     | 50 |
| Tablo 32. Olgu 1'e Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları .....                                                                | 52 |
| Tablo 33. Olgu 1'e Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları .....  | 52 |
| Tablo 34. Olgu 1'e Ait TED verisinin biyoinformatik analizinde gözlenen klinik ilişkili olabilecek varyantlar.....          | 53 |
| Tablo 35. Olgu 2'ye Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları .....                                                               | 54 |
| Tablo 36. Olgu 2'ye Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları ..... | 55 |
| Tablo 37. Olgu 2'ye Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar.....     | 55 |
| Tablo 38. Olgu 3'e Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları .....                                                                | 56 |
| Tablo 39. Olgu 3'e Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları .....  | 57 |
| Tablo 40. Olgu 3'e Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar.....      | 57 |
| Tablo 41. Olgu 4'e Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları .....                                                                | 59 |
| Tablo 42. Olgu 4'e Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları .....  | 59 |
| Tablo 43. Olgu 4'e Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar.....      | 60 |
| Tablo 44. Olgu 5'e Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları .....                                                                | 61 |
| Tablo 45. Olgu 5'e Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları .....  | 62 |
| Tablo 46. Olgu 5'e Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar.....      | 62 |
| Tablo 47. Olgu 6'ya Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları .....                                                               | 63 |
| Tablo 48. Olgu 6'ya Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları ..... | 64 |
| Tablo 49. Olgu 6'ya Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar.....     | 64 |
| Tablo 50. Olgu 7'ye Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları .....                                                               | 66 |

|                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 51. Olgu 7'ye Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları .....                               | 66 |
| Tablo 52. Olgu 7'ye Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar.....                                   | 67 |
| Tablo 53. Olgu 8'e Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları .....                                                                                              | 68 |
| Tablo 54. Olgu 8'e Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları .....                                | 69 |
| Tablo 55. Olgu 8'e Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar.....                                    | 69 |
| Tablo 56. Olgu 9'a Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları.....                                                                                               | 71 |
| Tablo 57. Olgu 9'a Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları .....                                | 71 |
| Tablo 58. Olgu 9'a Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olabileceği düşünülen varyantlar .....                              | 71 |
| Tablo 59. Olgu 10'a Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları .....                                                                                             | 73 |
| Tablo 60. Olgu 10'a Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Egenemaster Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları .....                              | 73 |
| Tablo 61. Olgu 10'a Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar.....                                   | 73 |
| Tablo 62. Serimizde saptanan klinik ilişkili olduğu düşünülen veya bilinen bir hastalık için tanımlanmış patojenik varyantların genlere göre dökümü ..... | 75 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Ebers Papirüsü .....                               | 5  |
| Şekil 2. Carlsberg Papirüsü.....                            | 5  |
| Şekil 3. Kahun Papirüsü.....                                | 6  |
| Şekil 4. Spermatozooanın Yapısı.....                        | 9  |
| Şekil 5. Testis Anatomisi ve Spermatogenez Basamakları..... | 10 |
| Şekil 6. Y Kromozomu Yapısı.....                            | 18 |
| Şekil 7. Olgu 1'e Ait Aile Ağacı .....                      | 51 |
| Şekil 8. Olgu 2'ye Ait Aile Ağacı .....                     | 54 |
| Şekil 9. Olgu 3'e Ait Aile Ağacı.....                       | 56 |
| Şekil 10. Olgu 4'e Ait Aile Ağacı .....                     | 58 |
| Şekil 11. Olgu 5'e Ait Aile Ağacı .....                     | 61 |
| Şekil 12. Olgu 6'ya Ait Aile Ağacı.....                     | 63 |
| Şekil 13. Olgu 7'ye Ait Aile Ağacı .....                    | 65 |
| Şekil 14. Olgu 8'e Ait Aile Ağacı .....                     | 68 |
| Şekil 15. Olgu 9'a Ait Aile Ağacı.....                      | 70 |
| Şekil 16. Olgu 10'a Ait Aile Ağacı.....                     | 72 |

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

**ACMG:** American College of Medical Genetics and Genomics

**AMH:** Anti Mülleryan Hormon

**AZF:** Azoospermia Factors

**bç:** Baz çifti

**CBAVD:** Bilateral konjenital vas deferans agenezisi

**CBAVD:** Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens

**CFTR:** Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

**CNV:** Kopya sayısı değişiklikleri

**DDM:** Data Driven Medicine

**ddNTP:** dideoksi nükleotid trifosfat

**DHT:** Dihidrotestosteron

**DNA:** Deoksiribonükleik asit

**dNTP:** Deoksinükleotid trifosfat

**ESP:** Exome Sequencing Project

**ExAC:** Exome Aggregation Consortium

**FSH:** Folikül stimulan hormon

**GH:** Gebelik haftası

**HiDi:** Highly deionized formamide

**KE:** Kapiller elektroforez

**KF:** Kistik fibroz

**LH:** Lüteinizan hormon

**MLPA:** Multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu

**MMP:** Matriks metalloproteinaz

**mRNA:** mesajcı RNA

**OD:** Otozomal dominant

**PSD:** Primer siliyar diskinezi

**PZR:** Polimeraz zincir reaksiyonu

**RNA:** Ribonükleik asit

**SCO:** Sertoli Cell Only

**SD:** Sanger Dizileme

**SRY:** Sex-Determining Region Y

**STS:** Sequence Tagged Sites

**TDF:** Testis belirleyici faktör

**TDG:** Tüm genom dizileme

**TED:** Tüm ekzom dizileme

**TGK:** Tekrarlayan gebelik kayıpları

**USG:** Ultrasonografi

**VUS:** Variant uncertain significance/önemi bilinmeyen varyant

**WHO:** World Health Organization

**YND:** Yeni nesil dizileme

**Y MD:** Y Mikrodelesyonu

**YÜT:** Yardımcı üreme teknikleri

## ÖZET

**Kale H.** Sebebi Açıklanamayan Erkek İnfertilitesinin Açıklanmasına Tüm Ekzom Analizlerinin Katkısı, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul. 2021.

**Amaç:** Tekrarlayan gebelik kaybı öykülü ( $\geq 2$ ) veya sekonder infertil olan çiftlerde kromozom ve Y mikrolelesyon anomalisi taşımayan erkek faktörün genetik etiyolojisinin yeni nesil dizileme yöntemiyle araştırılması amaçlanmaktadır.

**Yöntem:** İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 2014-2020 yılları arasında başvuran primer/sekonder infertilite ile tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan çiftlerden tanıya katkının artırılması için 34 anne adayına daha önceden Dr. Ezgi Gizem Berkay'ın doktora tezi kapsamında tüm ekzom dizi analizi yapılmış olup bu çiftler arasından etiyogenezi aydınlatılamayan 10 baba adayı seçildi

**Bulgular:** Çalışma kapsamında, 8 olguda fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde 14 varyant tespit edildi. İki olguda infertilite/TGK ile ilişkilendirilmiş aday genlerde herhangi bir varyant saptanmadı. Bir olguda *TCC21B* geninde saptanan patojenik bir varyant ile (Olgu 1) (%10) etiyoloji aydınlatıldı. Dört olguda *CFTR* geni ilişkili (%40), patojenik olarak tanımlanmış veya veritabanlarında patojenitesi henüz tam olarak aydınlatılamamış taşıyıcılık saptandı. Yedi olguda infertilite ve TGK kliniği ile ilişkisi net olarak açıklanamamış ancak aday genler arasında yer alan varyantlar saptandı (%70). Serimizde 2 olguda direkt infertilite ile ilişkili olmayan 2 gende patojenik varyant saptandı (%20). Bu hasatlıklardan biri dermatolojik (ikhtiyozis vulgaris), diğeri ise BMD ile ilişkiliydi.

**Sonuç:** İnfertilite/TGK ile ilişkilendirilmiş aday genlerin saptanması bu genlerin fenotip-genotip ilişkisini güçlendirmiştir. 2 olguda araştırma amacı dışında klinik durumların saptanması tanı veya araştırma amaçlı TED analizi yapılacak olgularda genetik danışmanın önemini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** tekrarlayan gebelik kaybı, infertilite, yeni nesil dizileme

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36968

## ABSTRACT

**Kale, H.** Contribution of All Exome Analyzes to Explaining Unexplained Male Infertility, Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics. Thesis in Medicine. İstanbul. 2021.

**Objective:** It is aimed to investigate the genetic etiology of the male factor without chromosomal and Y microdeletion anomaly in couples with a history of recurrent pregnancy loss ( $\geq 2$ ) or secondary infertility by next generation sequencing method.

**Method:** From the couples who applied to Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics between 2014-2020, who experienced primary/secondary infertility and recurrent pregnancy loss, 34 expectant mothers were previously consulted with Dr. Ezgi Gizem Berkay, within the scope of doctoral thesis, whole exome sequence analysis was performed and 10 father candidates whose etiology could not be clarified were selected among these couples.

**Results:** Within the scope of the study, 14 variants in genes that may be associated with the phenotype were detected in 8 cases. In two cases, no variants were detected in candidate genes associated with infertility/TGK. Etiology was clarified in one case (Case 1) (10%) with a pathogenic variant detected in the TCC21B gene. Carriage associated with the CFTR gene (40%), defined as pathogenic, or pathogenicity of which has not yet been fully elucidated in the databases, was detected in four cases. In seven cases, the relationship with infertility and RPL was not clearly explained, but variants among the candidate genes were detected (70%). In our series, pathogenic variants were found in 2 genes that were not directly associated with infertility (20%). One of these diseases was dermatological (ichthyosis vulgaris) and the other was associated with BMD.

**Conclusion:** Identification of candidate genes associated with infertility/TGK strengthened the phenotype-genotype relationship of these genes. The detection of clinical conditions other than the purpose of research in 2 cases shows the importance of genetic counseling in cases where TED analysis will be performed for diagnostic or research purposes.

**Keywords:** recurrent pregnancy loss, infertility, next generation sequencing

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 36968

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fertilite, Latince “fertilis” kelimesinden türetilmiş bir tanım olup üretken olma halini yani spermin dölleyebilir ve yumurtanın döllenebilir özellikte olduğunu ifade eder (1). Sağlıklı çiftlerde 12 aylık süre içerisinde gebelik olasılığı %85’tir (2). En az bir yıl vajinal yoldan, korunmadan, düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin gerçekleşmemesi “infertilite” olarak tanımlanır. Bu nedenle bilinen bir anomalisi olmayan çiftlerde infertilite değerlendirmesi için en az bir yıl beklenmesi önerilir (3). Genel popülasyonda infertilite insidansı %10-15 olarak bildirilmektedir (4). Dünya Sağlık Örgütü’nün verilerine göre vakaların yaklaşık %20’si erkek, %38’i kadın ve %27’sinin her iki cinsiyetten kaynaklandığı, %15’inde ise infertilite sebebinin açıklanamadığı bildirilmektedir (5). İnfertilite nedeniyle androloji polikliniğine başvuran olguların önemli bir kısmında erkekte saptanan sorun azospermi olup bunların yaklaşık %10-20’sinde rutin laboratuvar yöntemleriyle (kromozom analizleri, Y mikrolelesyon analizleri) tanı konulabilmektedir (162).

İnfertilitenin etiyolojisinde genetik faktörlerin yanı sıra sistemik hastalıklar ve çevresel etkilerin de yer aldığı bilinmekte ve bu durum tanıyı güçleştirmektedir. Genetik faktörler arasında cinsiyet kromozomlarının (X ve Y kromozomları) sayısal anomalilerinin (özellikle 47,XXY ve varyantları) bu faktörlerin başında geldiği uzun yıllardır bilinmektedir. Sayısal anomaliler dışında Y kromozomunun q kolu üzerinde yer alan “Azoospermi Faktörleri (AZF)” olarak adlandırılan bölgedeki mikrolelesyonlar da infertilite ile ilişkilidir (45). Bu nedenle, günümüzde, kromozom anomalilerinin tanısı için karyotip analiz ve Y mikrolelesyonlarına yönelik moleküler testler, azospermi olgularında rutin olarak kullanılmaktadır. Sık görülen tek gen hastalıklarından kistik fibrozis erkekte vaz deferens agenezisine yol açtığından infertilite ile ilişkilidir ve bu bulguyu taşıyan olgularda kistik fibroz tanısı amacıyla moleküler analizler yapılmaktadır.

İnfertilite etiyolojisinin aydınlatılması, bir çok test uygulanmasını gerektirmekte ve dolayısıyla test maliyetleri artarken sonuç alma süresi de uzamakta, tüm bu çalışmalara rağmen tanı her hastada mümkün olamamaktadır. Kromozom anomalileri ve Y mikrolelesyonu dışlanmış, anatomik ve yapısal olarak bir anomalisi olmayan erkeklerde görülen infertilite nedenlerinin altında büyük oranda tek gen mutasyonların

yattığı düşünülmektedir (68). İnfertilite ilişkili olası tek genin bilinmesi ya da bulguların yönlendirmesi durumunda (Kistik fibroz gibi) standart moleküler genetik yöntemleriyle (Sanger dizileme, vd) tanıya ulaşmak mümkün olabilmekte, ancak henüz tanımlanmamış genlerin araştırılması ise mümkün değildi ve bu olgular “açıklanamayan” olgu grubu olarak sınıflandırılmaktaydı.

2009 yılında tüm dünyada kullanılmaya başlanan ve ilerleyen yıllarda kullanımı artan yeni nesil dizileme (YND) teknolojisi yüksek kapasitesi ve hızı ile bir çok hasta ve genin eş zamanlı olarak dizilenmesinin yanı sıra insan genomundaki yaklaşık 20 000 genin, klinik bulgularla ilişkili gen/genlerin bilinmediği ya da bir çok genin ilişkili olabildiği durumlarda tüm ekzomun (TED) ya da genomun (TGD) tek bir test ile incelemesine olanak sağlayarak moleküler genetik analizlere çok önemli katkılar sağlamıştır. Bu teknoloji diğer genetik kökenli hastalıklarda olduğu gibi primer ve sekonder infertiliteyle ilişkili olabilecek yeni genlerin tanımlanması mümkün olacaktır ve etiolojinin aydınlatılmasının yanı sıra ilişkili genin belirlenebilmesi sonrasında genin fonksiyonuna/yolağına uygun olarak tedavi olanakları da söz konusu olabilecektir. Anabilimdalımızda bir doktora tezi ve projesi kapsamında TGK-infertilite ile ilgili 35 olguda TED analizi yapıldı. Henüz yayınlanmamış bu çalışma ile TED analizlerinin etkinliği açısından önemli sonuçlar gösterildi.

Bu çalışma ile, anatomik ve yapısal olarak herhangi bir anomalisi olmayan, kromozom anomalileri ve Y mikroleksyonu dışlanmış erkek olgularda, infertilite ile ilişkili tek gen mutasyonlarının TED yöntemi ile araştırılması, patogeneizde rol oynayan genlerin ve mutasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Uluslararası literatürde, bu yöntem ile erkek infertilitesinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (103,104,105,106,107). Çalışma sonuçlarının, primer ve sekonder infertil erkek olgularda patogeneizde rol oynayan genlerin ve mutasyonlarının belirlenmesine yönelik bilimsel literatüre katkı sağlayacağı gibi aile için tedavi seçeneklerinin belirlenmesine ve ailenin olası etkilenmiş diğer bireylerinin erken tanı almasına, ailelerin olası gebeliklerinde fetüs için bir risk varsa aileye prenatal/preimplantasyon genetik tanı olanaklarının sunulmasına, doğru tanı ile gereksiz tıbbi müdahalelerin önlenmesine ve dolaylı olarak genel sağlık giderlerinin azaltılmasına katkı sağlanması beklenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

İnsanlık tarihi boyunca “üreme sağlığı” son derece önemli bir konu olarak kabul edilmiş ve konu hakkında çok sayıda felsefi görüşler öne sürülerek, hipotezler kurulmuş ve çağına uygun araştırmalar yapılmıştır. Üreme sağlığına ilişkin sorunlar, insanlığın ilk çağlarından beri ciddi maddi ve manevi etkilere yol açmıştır. Kadınlar fertilitenin kaynağı olarak görülmüş ve sağlıklı bir gebelik gerçekleşmediğinde olayın sorumlusu olarak görülmüştür.

Antik çağlardan bu yana bir çok kültür üreme sorunlarına çözümler aramıştır. Üreme sağlığına ilişkin gebeliğin belirlenmesi ve önlenmesi gibi konuları içeren ilk yazılı metinlere antik Mısır’da rastlanmaktadır. Birçok antik kültürde infertilite ilahi bir ceza olarak değerlendirmesine karşın Mısırlılar konuya tıbbi bir sorun olarak yaklaşmışlardır. Eski Mısır papirüslerinde çok sayıda hastalık ve tedaviden bahsedilmektedir. M.Ö. 1500 yılına tarihlendirilmiş olan *Ebers Papirüsü* anatomi, fizyoloji, cerrahi uygulamalar, üreme sağlığı ve kadın hastalıklarına ilişkin bilgiler içermektedir (Resim 1). M.Ö. 1300 tarihli 19. ya da 20. Sülale Dönemi’ne ait olan iç hastalıkları, cerrahi, göz hastalıkları, jinekoloji ve doğumla ilgili bilgilerin yer aldığı *Carlsberg Papirüsü* de antik dönem tıp uygulamaları hakkında bilgi vermektedir (Resim 2). Bir diğer bilgi kaynağı da M.Ö 1825’de yazıldığı düşünülen *Kahun Papirüsü*’dür (Resim 3). Kahun papirüsünün oldukça yıpranmış olmasına ve birçok bölümünün okunamamasına rağmen üreme organları, doğum yapmasında sakınca görülmeyen kadınların belirlenmesi, doğum kontrol yöntemleri ve çocuğun cinsiyetinin belirlenmesiyle ilgili bilgiler yer almaktadır (6).

Toplumsal hayatta kısır bir kadın ve erkeğin maruz kaldığı ötekileştirme Sümer Gılgamış Destanı’nda aşağıdaki dizelerle anlatılmaktadır:

“Hiç çocuğu olmayan kadını, gördün mü?

-Gördüm: Kırık bir çömlekmış gibi, hiç kimse hoşlanmıyor ondan!

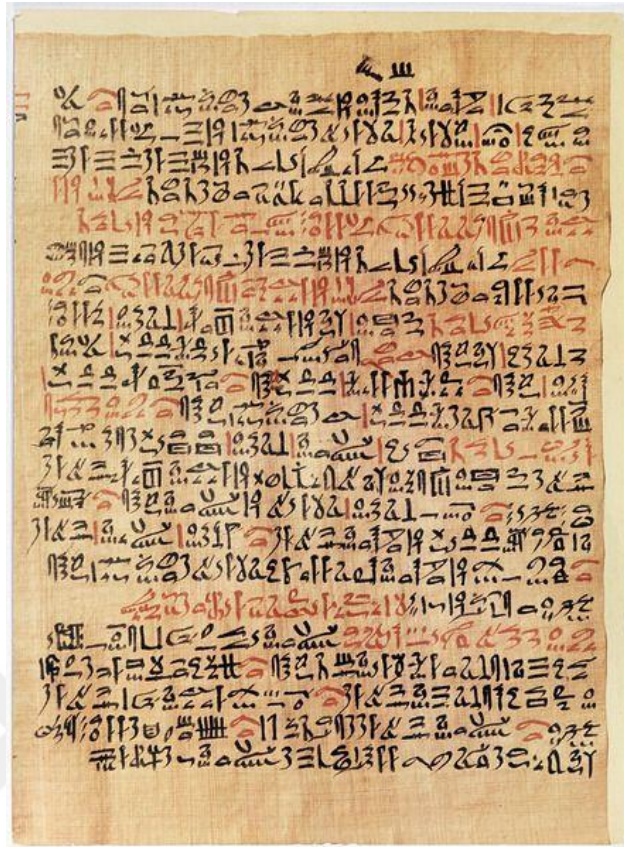
Sarayda bir hadım gördün mü?

-Gördüm: İşe yaramaz bir baston gibi köşede yaslanır!”(89).

Antik Mısır papirüslerinde bildirilmiş olan yöntemlerin bazıları Hippokrates (MÖ 460-370) tarafından kullanmış ve aktarılmıştır. Bunlardan bazıları gebe kadının

idrarı ile bazı bitki tohumlarının çimlenme sürecine bakılarak cinsiyet tayini yapılması, kısırlık tespiti için vajene soğan yerleştirilmesidir. Hippokrates'in yazmış olduğu düşünülen *Kadın Hastalıkları Kitabı*, *Kadının Doğası Üzerine* ve *Fetüsün Çıkarılması* gibi döneme ait kitaplar bulunmaktadır (7). Romalılar ve Araplar bu metinleri tıbbi uygulamalarında kaynak olarak kullanmışlardır. Batıda Avicenna olarak bilinen İbn-i Sina'nın *El-Kanun fi't-Tıb* kitabında infertilitenin hem kadın hem erkeklerden kaynaklı olabileceği, erkeklerin ürettiği menideki sorunlardan veya kadın ürogenital anatomisindeki bozukluklardan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (8). Yukarıda adı geçen üç ana kaynak rönesanstan sonraki döneme kadar Avrupa ve Ortadoğu'da infertiliteye yönelik tıbbi bakış açısını oluşturmuştur. Rönesans döneminde Leonardo da Vinci ve Vesale gibi anatomistlerin kadın ve erkek ürogenital anatomisini ayrıntılarıyla resmetmesi ve teknoloik gelişmelerin de katkısıyla bu alandaki araştırmalar artmıştır.

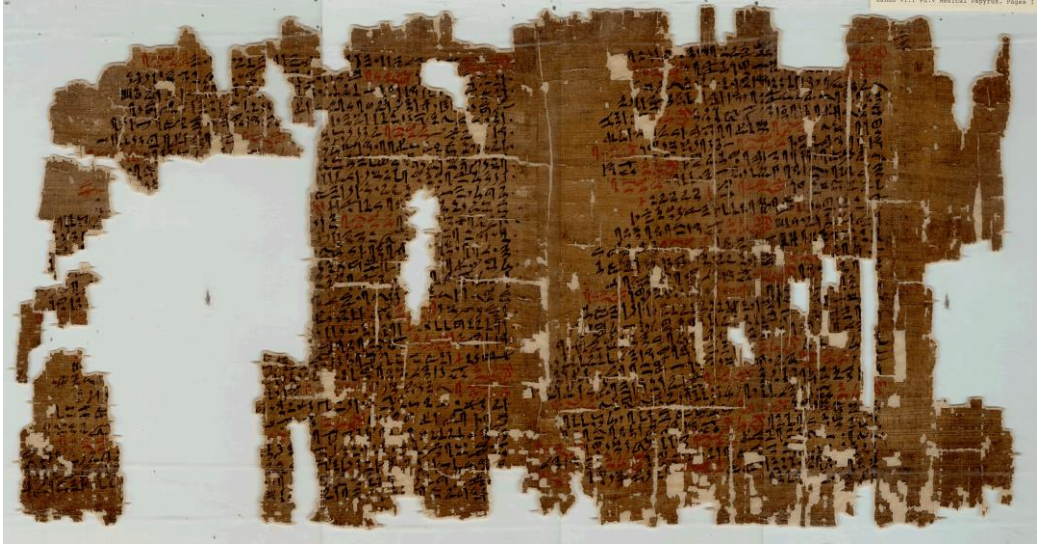
Mikroskopun kullanılmaya başlanması ile birlikte üreme sağlığı hakkındaki araştırmalarda ciddi bir ilerleme ve aydınlanma yaşanmıştır. 1677 yılında Anton Van Leeuwenhoek tarafından sperm ilk defa mikroskop altında incelenmiş ve semen kuyruklu bir yapı olarak tariflenmiştir. Leeuwenhoek ve öğrencisi spermin insan vücudunda gelişen insanın minyatür bir prototipi olduğunu düşünerek "ilk oluşum teorisi" (preformation theory) fikrini ortaya atmışlardır. Bu teori spermatozoa oosite girdikten sonra minyatür bir insanın geliştiğini öne sürmektedir (9). Martin Naboth, infertilitenin başlıca nedeni olarak ovaryan sklerozis ve tüplerin tıkanıklığına işaret etmiştir. Morgani, foliküler agenezi ve ürogenital anomalilerin infertilite nedenleri arasında olduğunu belirtmiştir. Amerikan jinekolojisinin babası olarak görülen Sims, infertilitenin sebebini açıklamada mikroskop altında sperm kalitesinin incelenmesinin yararlı olacağını belirtmiştir. Macomber ve Senders, sperm sayımının kurallarını belirleyerek infertil erkeklerin değerlendirilmesinde semen analizinin esaslarını belirlemiştir (10). Huggins ve Johnson'ın semenin biyokimyası ile ilgili yaptığı çalışmalar semenin hücresel olmayan kısmı ile ilgili çalışmalara öncülük etmiştir (11). Sperm sayısının normal olması ile birlikte seminal sıvının kimyasal komponentinin fertilizasyon için önemli olduğu ilk kez 60'lı yıllarda Mann tarafından ortaya konmuştur (12). Endokrinolojide ki gelişmeler, infertilitenin günümüzde ilişkili sebeplerin ortaya çıkarılmasına çok önemli katkılar sağlamıştır (6).



Şekil 1. Ebers Papirüsü (<https://egypt-museum.com/post/169818095581/the-ebers-papyrus>)



Şekil 2. Carlsberg Papirüsü (<https://www.ancient-origins.net/carlsberg-papyrus>)



**Şekil 3. Kahun Papirüsü**

(<https://www.ucl.ac.uk/museumsstatic/digitalegypt/med/birthpapyrus.html>)

## 2.2. Erkek Üreme Sistemi

### 2.2.1. Erkek Genital Sisteminin Embriyonik Gelişimi

Fertilizasyon esnasında sperm ile aktarılan cinsiyet kromozomuna (X veya Y) bağlı olarak zigotun kromozomal cinsiyeti belirlenmiş olur; ancak gebeliğin 7. haftasına kadar gonad gelişiminde cinsiyete özgün farklılaşma olmamaktadır. Batın arka duvarında aortun her iki yanındaki mezotelyum, mezenkim ve primordial germ hücreleri olmak üzere 3 kaynaktan köken alan gonadlar, 5. gebelik haftasında mezonefroz proksimalinde kalınlaşmaya başlar ve hem mezonefrik (Müllerian) hem de paramezonefrik (Wolfian) kanallar gelişmeye başlar. 6 ve 7. haftalarda başlayan farklılaşma Sertoli hücre gelişimi ile devam eder ve Sertoli hücrelerinden anti-Müllerian hormon (AMH) salınımı indüklenerek Müllerian kanalın gerilemesi sağlanır. 7. haftadan sonra Y kromozomunun p kolu üzerinde yer alan *Sex Determining Region Y* (SRY) genin varlığında gonadal gelişimin erkek yönünde, yokluğunda ise kadın yönünde farklılaşması sağlanır. 9. haftayı takiben Leydig hücre gelişimi, epididim ve vas deferens kanallarını oluşturmak üzere Wolfian kanal gelişimini uyaran testosteron salgısı başlar. Testosteron dihidrotestosterona dönüştürülerek dış genital yapının oluşması sağlanır. Böylece dış genital yapı 10-15. gebelik haftaları arasında gelişir ve

Sertoli hücreleri spermatogenezin gerçekleşeceği seminifer tübüllere (testiküler kanallar) yerleşir (13).

### 2.2.2. Hipotalamus, Hipofiz ve Testis Arasındaki İlişki

Hipotalamustan salınan gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) hipofizden LH ve FSH salınımını başlatır. Bu iki hormon testiste spermatogenez ve testosteron üretimini uyarır. Bu uyarılar bütünü hipotalamo-hipofizer-gonadal aks olarak tanımlanır (14).

Testis başlıca iki yapıdan oluşur; Leydig hücrelerinin de yer aldığı interstisyel doku ve spermatogenezin gerçekleştiği seminifer tübüller. Testisler testosteron üreten Leydig hücrelerini ve olgun spermlerin beslenmesini sağlayan, fagositoz yapan, sıvı sekresyonu ile çeşitli molekülleri ve inhibin hormonunu salgılayan Sertoli hücrelerini içermektedir (15).

Sertoli hücreleri; seminifer tübüllerin duvarına yerleşmiş olup AMH ve androjen bağlayıcı protein etkisiyle mezenkim hücrelerinden Leydig hücrelerinin oluşmasını sağlar, seminifer tübüllerde germ hücreleri komşuluğunda bulunur ve germ hücrelerinin beslenmesini sağlar. Kan-testis bariyeri oluşumunda ve spermatogenez basamaklarının çoğunda Sertoli hücreleri önemli görevler alır. Epididim ise spermin olgunlaştığı yerdir (16).

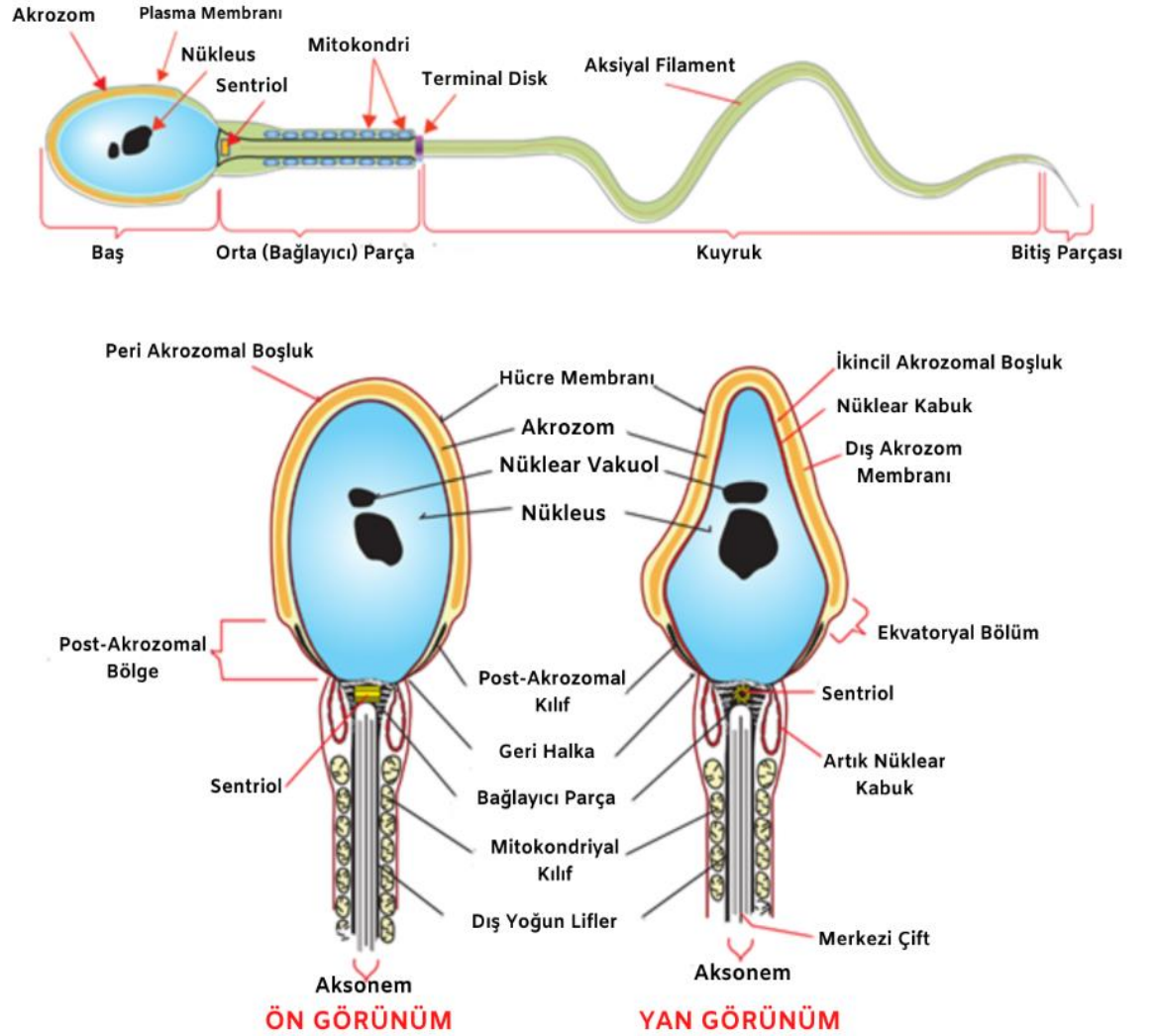
### 2.2.3. Spermatogenez

Spermatogenez, 46 kromozomlu spermatogoninin, mayoz bölünme ile 23 kromozomlu spermatozoaya dönüşüm sürecidir. Spermatogenez çeşitli tiplerde hücrelerin, hormonların, parakrin faktörlerin, genlerin ve epigenetik faktörlerin katıldığı oldukça kompleks bir süreçtir ve seminifer tübüllerde gerçekleşen bu olay yaklaşık 42-76 gün sürer (17,18). Süreç, spermatogonyum proliferasyonu, spermatosit diferansiyasyonu, spermatositlerin mayotik bölünmesi sonucu spermatidlerin oluşumu, matürasyonu ve testiküler tübül lümenine matür spermatozoanın salınımı aşamalarını içerir (19).

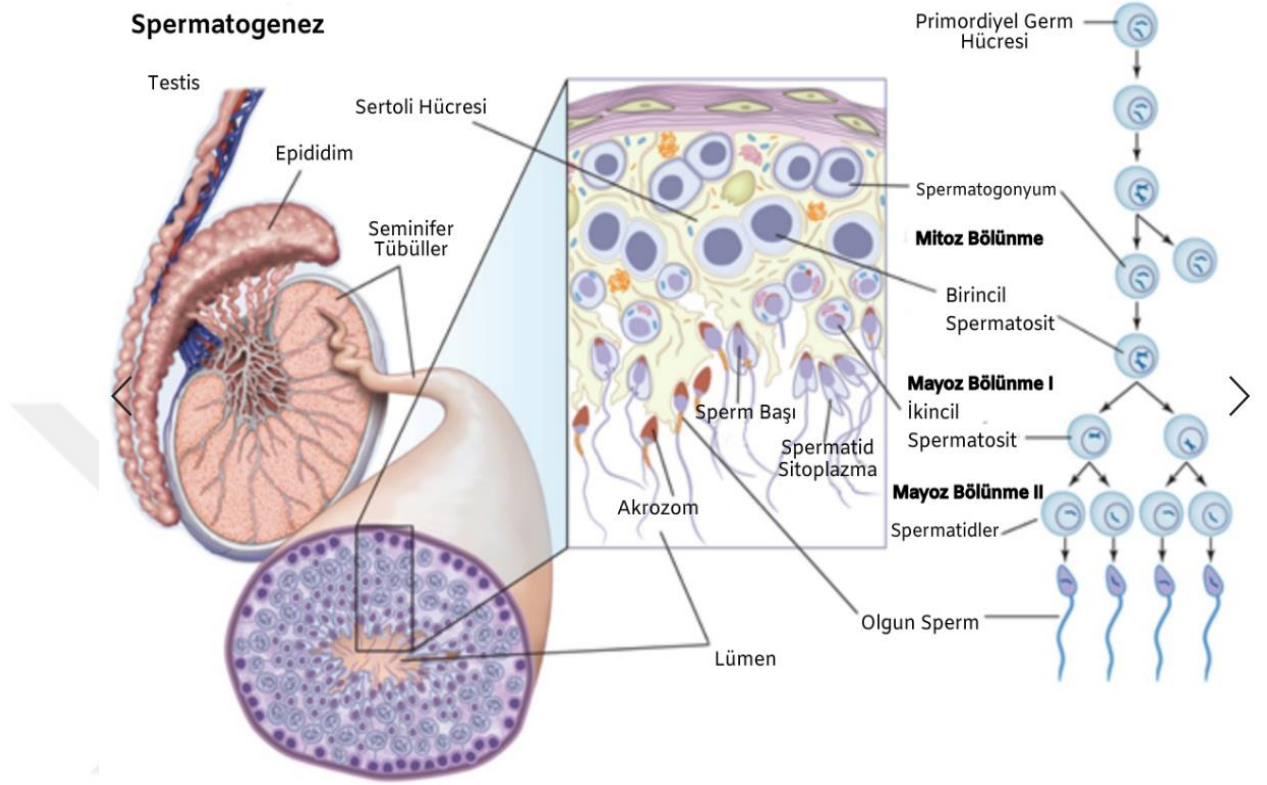
Erkek germ hücreleri, tek amaçları genetik bilgiyi sonraki nesillere aktarmak için spermatozoaya dönüşmek olan bir grup hücreyi içerir. Seminifer tübüllerin içinde oldukça organize yerleşimli olup mayoz bölünme kapasitesine sahip tek hücre tipidir. Özellikle yaşamın 5-7. yılından sonra mitotik olarak aktif olup bu yaştan itibaren sayıca

çoğalmaya başlarlar. Puberteyle (10-13 yaş) birlikte de spermatogonyanın olgun spermatozooya dönüşümü başlamış olur (20). Spermatogonyum, bütün diğer germ hücre çeşitlerinin diploid öncülüdür ve hem mitoz geçirerek sayısını koruması hem de farklılaşarak mayoz bölünmeyle olgun hücrelere dönüşmesiyle önemli bir görevler üstlenir. Spermatogonyumların üç tipi olduğu bildirilmektedir: soluk A, koyu A ve B (21). Son zamanlarda kabul edilen modele göre soluk A tipi spermatogonyumların aktif kök hücreler olduğu, koyu A tipi olanların rezerv görevi taşıdığı, B tipi hücrelerin ise mayoz girmeden önceki halleri olduğu düşünülmektedir (22). Primer spermatositler, B tipi hücrelerden mitoz bölünme ile oluşur. Bu hücreler mayoz bölünmede önce DNA'larını çoğaltarak  $4n$  kromozom yapısına ve ardından bölünerek  $2n$  kromozomlu sekonder spermatositlere dönüşürler ve Mayoz II'de ise  $n$  kromozomlu spermatidler oluştururlar (23). Mayoz bölünme sonrasında her biri haploid kromozoma sahip olan dört spermatid oluşur ve spermatogenezis aşaması tamamlanır. Bu aşamadan sonra "spermiyogenez" olarak adlandırılan metamorfoz süreci başlar ve sitoplazma kaybı, çekirdek yoğunlaşması, kuyruk gelişimi, akrozom oluşumu gerçekleşir ve sitoplazmadaki organellerin de yeri değişerek olgun spermatozoa (sperm) oluşur (24).

Uzunluğu yaklaşık 0.05 mm büyüklükte olan spermatozoa hücre morfolojisi baş, gövde ve kuyruk olarak üç kısımdan oluşmaktadır. Baş kısmın büyük bölümü akrozom denilen ovuma girişi sağlayan bir kılıftan oluşan, bol miktarda lizozomal enzim (hiyalüronidaz ve proteolitik) içeren ve genetik materyali içeren bölümdür. Gövde denilen orta kısımda bulunan çok miktarda mitokondri ile spermin motilitesi için gereken enerji ihtiyacı karşılanır. Flagellum (kuyruk), spermin hareketiyle görevlidir. Flagellumun ana yapısı aksonemdir ve motilite için elzem olan protein ve enzimleri bulundurur (25).



Şekil 4. Spermatozoanın Yapısı (Gray's anatomy 36th edition, Williams & Warwick, 1980; "Formation and organization of the mammalian sperm head" from Kiyotaka Toshimori and Chizuro Ito., değiştirilerek alınmıştır)



**Şekil 5. Testis Anatomisi ve Spermatogenez Basamakları**  
(<https://www.britannica.com/science/spermatogenesis>, değiştirilerek alınmıştır)

### 2.3. Gebeliğin Oluşumu

Dişi üreme sistemi içerisinde tamamlanan ‘kapasitasyon’ spermin bir ovumu dölleyebilmesi için geçirdiği süreçlerden en önemlisidir. Bu süreç spermin zona pellusidayı geçme işlemi öncesinde tam hazır hale gelebilmesi için dişi genitalinde servikal ve tubal sekresyonların yardımı ile geçirdiği olgunlaşma sürecidir. Sperm bu evrede mobilite kazanır ve ovumun çevresindeki *zona pellucida* tabakasına tutunup enzimatik aktivite ile bu tabakayı delerek ovum içine girdiği *Akrozoim reaksiyonu* gerçekleşir. Fertilizasyon en sık Tuba uterinanın (fallop tüplerinin) ampulla kısmında gerçekleşir ve fertilizasyon aşaması yaklaşık 24 saat sürer. Bu aşamaya kadar herhangi bir sorun ya da bozukluk ile karşılaşılmazsa gebelik gerçekleşir (26). Uygun koşullarda

(nötral veya hafif alkali koşullarda) sağlıklı spermier 1 ila 4 mm/dak hızla ilerleyebilir. Sperm, dişi genital sisteminde en fazla 1-2 gün canlılığını koruyabilir. Her bir cinsel birleşmede 3,5 ml semen ejakülat içinde yaklaşık 120 milyon/ml sperm atılır (27).

## **2.4. İnfertilite**

Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre infertilite, bir yıl ya da daha çok süreyle korunmadan, vajinal yoldan düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik oluşmaması hali olarak tanımlanmıştır (28).

İnfertilitenin iki tipi vardır. Çiftlerin, bir yıl veya daha uzun süre düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmamasına “primer”; çiftin canlı veya değil gebelik öyküsünün bulunması, ancak sonrasında yine bir yıl denemeye rağmen gebelik oluşmaması ise “sekonder” infertilite olarak tanımlanır (29).

### **2.4.1. İnfertilite Sebepleri**

İnfertilite genel popülasyonda çiftlerin yaklaşık %9-18'ini etkileyen küresel bir sorun olarak görülmektedir. Dünyanın birçok bölgesinde halen olgular ‘kısırlık’ ile damgalanmakta ve infertilitenin oluşmasından yüksek oranda kadınlar sorumlu tutulmaktadır. Ancak infertilitenin nedenleri, kadına, erkeğe, kadın ve erkeğe ait ve açıklanamayan sebepler olarak 4 ana başlıkta incelenir (30).

#### **2.4.1.1. Kadın İnfertilitesi**

Kadın fertilitesi genetik, nongenetik ve dış faktörler gibi bir çok değişkenden etkilenmektedir.

##### **Maternal Yaş**

Bu değişkenlerin en önemlilerinden biri biyolojik yaş faktörüdür. İlerleyen anne yaşı ile over folikül kalitesinin azalmaya başlaması sonucu ovumun implantasyon başarısında da azalma gözlenir. Oluşan zigotlarda kromozom anomalisi ve spontan abortus oranı artarken canlı doğum oranı azalır (31).

##### **Ovulasyon Sorunları**

Kadın infertilitesinin en önemli sebebi ovulasyon sorunlarıdır. Hipotalamik disfonksiyon, prematür ovaryan yetmezlik ve prolaktin yüksekliği gibi patolojilerden

kaynaklanan ovulasyondaki düzensizlikler sonucu oluşan polikistik over sendromu kadın infertilitesinin bilinen nedenleri arasındadır (31).

### **Tubal Faktörler**

Kadınlarda ikinci sıklıkta görülen infertilite sebebidir. Batın cerrahileri, pelvik enfeksiyona neden olabilen yabancı maddeler, endometriyozise sekonder adezyonlar veya tüberküloz gibi granülamatöz inflamatuvar hastalıklar tubal tıkanıklığa sebep olur ve ovumun fallop tüplerine ulaşmasını ve uterusu ilerlemesini engelleyebilir (31).

### **Servikal Faktörler**

Spermin servikal mukusu geçebilmesi için mukusun ince, artmış miktarda ve alkalen olması gerekir (32). Bu salgı ovulasyon sırasında sperm geçişine izin verir. Enfeksiyon gibi nedenler ile mukus pH'sında ve yoğunluğunda değişikliğin oluşması ve salgının içindeki anti-sperm antikorlarının sperm ölümüne neden olması sonucu ovulasyon sırasında dahi spermin uterusu ulaşmasına engel olarak infertilitenin oluşmasına neden olabilir (31).

### **Uterin Faktörler**

Benign polip veya tümörlerin uterusu görülmesi oldukça yaygındır. Bunlardan bazıları fallop tüplerini bloke ederek implantasyona engel olabilmektedir. Aynı şekilde endometriozis de skar ve inflamasyona neden olarak implantasyonu engelleyebilmektedir. Doğumsal uterin anomaliler de infertilitenin önemli sebepleri arasında anılmaktadır (33).

Genetik ve sistemik hastalıklar, sigara, madde veya alkol bağımlılığı, zührevi hastalıklar, kaşeksi veya obezite ve psikiyatrik sorunlar da kadın infertilitesi ile ilişkili olabilmektedir (33).

#### **2.4.1.2. Erkeklerde İnfertilite**

Erkeklerdeki fertilite sorunlarının önemli bir bölümü sperm analizinde saptanan morfolojik anormalilerle belirlenebilir. Sperm kalite ve miktarında azalma, infertilite insidansı ve testis kanserlerinin görülme sıklığında son yıllarda artış olduğu bildirilmektedir. Günümüzde infertil erkek olguların yaklaşık %40'ında infertilite nedeni "idiyopatik" olarak belirtilmektedir (33).

### **Pretestiküler Sebepler**

Hipotalamus ve hipofiz aksındaki patolojiler sonucu seviyesi azalan FSH ve LH'a sekonder düşük testosteron sonucu spermatogenez sürecinde sorun oluşur. Pretestiküler infertilite sebeplerinin başında hipogonadotropik hipogonadizme neden olan bütün patolojiler yer almaktadır (34). Bunun dışında erektil disfonksiyon ve ejakülasyonda bozukluğa neden olabilecek tüm patolojiler (geçirilmiş cerrahi, nöral bozukluklar, ilaca bağlı, vb.) yine pretestiküler sebepler arasında sayılabilir (34).

### **Testiküler Sebepler**

Testiküler sebepler arasında belki de en önemlileri genetik kaynaklı patolojilerdir. Klinefelter sendromu, Y kromozom mikrodelesyonları, immotil silia sendromu gibi hastalıklar genetik kaynaklı infertilite sebeplerinin başında gelmektedir. Önemli bir başka testiküler sebep de kriptorşidizmdir. Sperm sağlığı açısından ideal düzeyde olması gereken testis sıcaklığının, testislerin skrotuma inmemesi ile internal vücut ısısına maruz kalması sonucu artması sperm fonksiyonunda bozulmalara neden olmaktadır. Çift taraflı inmemiş testis vakalarında sperm kalitesinde bozulmalar olduğundan fertilite oldukça düşüktür ve çoğu vakada azospermi söz konusu olur (34). Spermatik venlerde kanın reflüsü sonucu testiküler dolaşımın bozulmasına neden olan varikozel sık rastlanılan ve kolaylıkla tedavi edilebilen infertilite nedenlerindendir. Bu hastalığın tedavisinde uygulanan varikosektomiye takiben 12 ayda sperm sayısında artış hastaların yarısında gözlenmektedir (35).

Sertoli only sendromu (SCO) germ hücrelerinin yokluğu ve sertoli hücrelerinin seminifer tübülleri kapladığı bir hastalıktır. Hastalar yüksek FSH'lı ve azospermiktir. Etiyolojisi ise genelde idiyopattır (36). Maturasyon arresti normal androjenizasyona ve testis boyutlarına rağmen spermatosidlerin spermatozoaya dönüşümünde araste neden olan sebebi tam olarak açıklanamamış bir durumdur (36). Testiküler sebepler arasında radyasyon, kemoterapi ve yüksek ısı maruziyeti de yer almaktadır (37).

### **Posttestiküler Sebepler**

Posttestiküler sebepler genelde obstrüktif azospermiye neden olur. Bu sebepler arasında konjenital vas deferens yokluğu önemli bir yer tutmaktadır. *CFTR* gen mutasyonları sonucu ortaya çıkan bu durum, genetik kaynaklı infertilite nedenleri arasındadır (38). Bunun dışında vazektomi veya geçirilmiş diğer cerrahilerin komplikasyonları penisin koitusa engel olacak anatomik bozuklukları, epididimal astenozoospermi gibi nedenler de posttestiküler sebepler arasında sayılabilir, bu

sorunlarda spermatogenezde bozukluk olmadığından yardımcı üreme teknikleri genelde başarılı sonuçlar vermektedir.

#### 2.4.2. Spermiyogram Analizi

Dünya Sağlık Örgütü 2010 yılında sperm analizi kriterlerini yenilemiştir. Eski ve yeni kriterler karşılaştırmalı olarak Tablo 1’de gösterilmiştir (32). Semen analizinde 15 milyondan fazla sperm bulunmasına ek olarak diğer kriterlerin de normal saptanması “normospermi” anlamına gelmektedir (32). Semen, vas deferensden posterior üretraya ulaştırılamazsa veya retrograd yönde ilerlerse ejakulat yokluğuna rastlanır ve bu durum “aspermi”, sperm konsantrasyonunun 15 milyon/ml’den düşük olması “oligospermi”, 5-10 milyon/ml arası sperm gözlendiği durumlar “orta oligospermi”, sperm miktarının 5 milyon/ml’nin altında olduğu vakalar ise “ciddi oligospermi” olarak tanımlanır (32).

Normal sperm morfolojisine sahip sperm hücre oranının %4’ün altına düşmesi durumu “teratozoospermi” olarak tanımlanır ve çoğunlukla oligospermi ve astenozoospermiyle birlikte görülür. Motilite parametresine göre hareket yeteneğinin %40’ın altına düşmesi ise “astenozoospermi” olarak tanımlanır (32).

**Tablo 1. Karşılaştırmalı Spermiyogram Kriterleri**

| <b>Parametreler</b>                          | <b>1999-WHO</b> | <b>2010-WHO</b>      |
|----------------------------------------------|-----------------|----------------------|
| <b>Semen Hacmi (volum-ml)</b>                | <b>&gt;2</b>    | <b>1,5 (1,4-1,7)</b> |
| <b>Toplam sperm sayısı (milyon/ejakulat)</b> | <b>40</b>       | <b>39 (33-46)</b>    |
| <b>Sperm konsantrasyonu (milyon)</b>         | <b>20</b>       | <b>15 (12-16)</b>    |
| <b>Motilite (%)</b>                          | <b>&gt;50</b>   | <b>40 (38-42)</b>    |
| <b>İleri hareket (%)</b>                     | <b>25</b>       | <b>32 (31-34)</b>    |
| <b>Yaşayan Sperm (%)</b>                     | <b>75</b>       | <b>58 (55-63)</b>    |
| <b>Sperm morfolojisi (% normal)</b>          | <b>15</b>       | <b>4 (3-4)</b>       |
| <b>pH</b>                                    | <b>&gt;7,2</b>  | <b>&gt;7,2</b>       |
| <b>Lökosit (milyon/ml)</b>                   | <b>&lt;1</b>    | <b>&lt;1</b>         |

Ejekülatın santrifüjü sonrasında pellette hiç sperm bulunamaması durumu yani “azospermi” infertil erkek popülasyonun %10-15’inde gözlenir (32). Obstrüktif ve spermatogenez bozukluğu sonucu oluşan non-obstrüktif azospermi olmak üzere 2 tipi

bulunur. Obstrüksiyon varlığında sperm dışarı atılamadığından azoospermi görülür ancak olguların önemli kısmında spermatogenez normaldir ve obstrüksiyonun tedavi edilmesi durumunda sperm sayısında düzelme görülür. Obstrüktif azoosperminin (OA) sık sebeplerinden biri *CFTR* gen mutasyonlarına bağlı konjenital vas deferans yokluğudur (38).

## 2.5. Y Kromozomu ve Yapısı

Yaklaşık 60 Mb uzunluğundaki Y kromozomu, tüm kromozomlar arasında en küçük olan kromozomdur ve gen sayısı azdır ancak bu genler gonadların testis yönünde gelişimini ve sekonder karakterlerinin erkek olarak farklılaşmasını ve spermatogenez denetleyen genlerdir (39).

Genomda homoloğu olmayan tek kromozom Y kromozomudur, sadece kromozomun uçlarındaki psödotozomal region 1 (PAR1) ve 2 (PAR2) bölgeleri ile mayoz bölünme sırasında X kromozomu ile eşleşir. Bu bölgeler dışında kalan yani X kromozomu üzerinde bir homoloğu olmayan genler yalnızca paternal geçişle aktarılır. Bu bölge *Erkek Spesifik Bölge (MSY -Male Specific of Y chromosome)* olarak isimlendirilir (40). MSY’de bulunan genlerin kodladığı protein ailelerinin 9’u yalnızca testiste bulunmaktadır (41).

Y kromozomunun büyük kısmı rekombinasyona girmeyen, düşük kopya tekrarları (low copy repeats) açısından zengindir. Adli tıp çalışmaları, antropogenetik çalışmalar, aile ağaçlarının belirlenmesi, babalık testleri Y kromozomu üzerindeki bu erkeğe özgün bölge üzerinde yapılan çalışmalarla mümkün olmaktadır. Cinsiyet kromozomları dışındaki genler, homologları bulunduğu mitoz kontrol noktalarında kolaylıkla tamir edilebilirlerken Y kromozomu üzerindeki homoloğu bulunmayan genlerin yerine geçecek bir mekanizma veya bir tamir olanağı bulunmamaktadır. Y kromozomu üzerindeki genlerin kopya sayısının farklılık göstermesinin başlıca nedeni budur ve spermatogenezde görev alan genlerin hasara uğramalarının yıkıcı etkisi önlenmiş olur (42).

### 2.5.1. SRY (Sex Region of Y) geni-Testis belirleyici faktör (TDF)

Intrauterin gonadın testise dönüşmesini Y kromozomunun kısa kolunda (p) bulunan *SRY* (Sex Region of Y / Y kromozomunun cinsiyeti belirleyen bölgesi) geni sağlar, bu nedenle *TDF* (Testis Belirleyici Faktör) geni olarak da adlandırılmıştır. DNA

bağlayıcı olarak görev alan türler arası korunmuşluğu yüksek HMG-Box (High Mobility Group) dizisi *SRY* geni içerisinde lokalizedir. HMG-box bölgesi transkripsiyonu düzenleyen bir sinyal yolağını denetler ve bu bölge mutasyonlarının 46,XY dışı fenotipi oluşturabildiği bildirilmiştir (43).

### 2.5.2. Y Mikrodelesyonları

Azospermik hastalarda Yq11 bölgesindeki delesyonların sık görülmesi sebebiyle bu bölge *Azoospermik faktör (AZoospermia Factor)-AZF* olarak adlandırılmış ve alt bölgelere ayrılmıştır (44-45).

*AZF* bölgesindeki birçok gen spermatogenez sürecinin farklı aşamalarında aktiftir ve bu bölgedeki genlerin haritalanması Y-DNA fragmanlarının klonlanmasıyla gerçekleşmiştir. *STS (sequence tagged sites)* ismindeki bu bölgelerin analizi ile nonobstrüktif azospermik erkeklerde mikrodelesyon varlığı belirlenebilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanabilen *STS*'ler kullanılarak haritalama çalışmaları yapılabilmektedir (45).

#### **AZF<sub>a</sub> bölgesi**

796 Kb uzunluğunda olan bu bölge *AZF<sub>b</sub>* ve *AZF<sub>c</sub>* bölgelerinin aksine tek kopya DNA içermektedir. Yq proksimal bölgesinde yerleşmiş olup bölgeyi iki endojen insan retrovirüsü elementleri sınırlamaktadır. Bu iki bölge arasındaki delesyonlar bütün *AZF* delesyonlarının yaklaşık %5'ini oluşturur ve büyük oranda Sertoli Only Hücre (SCO) sendromu ile ilişkilendirilir (45). Aynı zamanda X üzerinde homoloğu bulunan ubikitin spesifik peptidaz-9 (*USP9Y*) ve DEAD box polipeptid-3 (*DDX3Y*) isimli genler bu bölgede bulunur ve farklı dokularda okunabilen genlerdir (44). *USP9Y* bir ubikitin proteaz proteinidir ve C19 sistein peptidaz ailesinin bir üyesidir. Spermatogenezde protein döngüsünde görevli olduğu düşünülmektedir (46). *DDX3Y* proteini ATP-bağımlı bir RNA helikaz ailesine aittir. Tam görevi bilinmese de RNA metabolizmasında görev aldığı düşünülmektedir (47). Bunlar dışında *TB4Y* ve *UTY* isimli genler de bu bölgede bulunmaktadır. Bunlardan *TB4Y* testise özgündür ve aktin salınımında görev alan timozin B4'ün Y kromozomu izoformunu kodlamaktadır (48).

#### **AZF<sub>b</sub> bölgesi**

Komplet *AZF<sub>b</sub>* bölge delesyonları nadir görülmektedir (%3-10) (44). Bu bölge delesyonlarında germ hücrelerindeki mayotik duraksama sonucu azoospermi ve

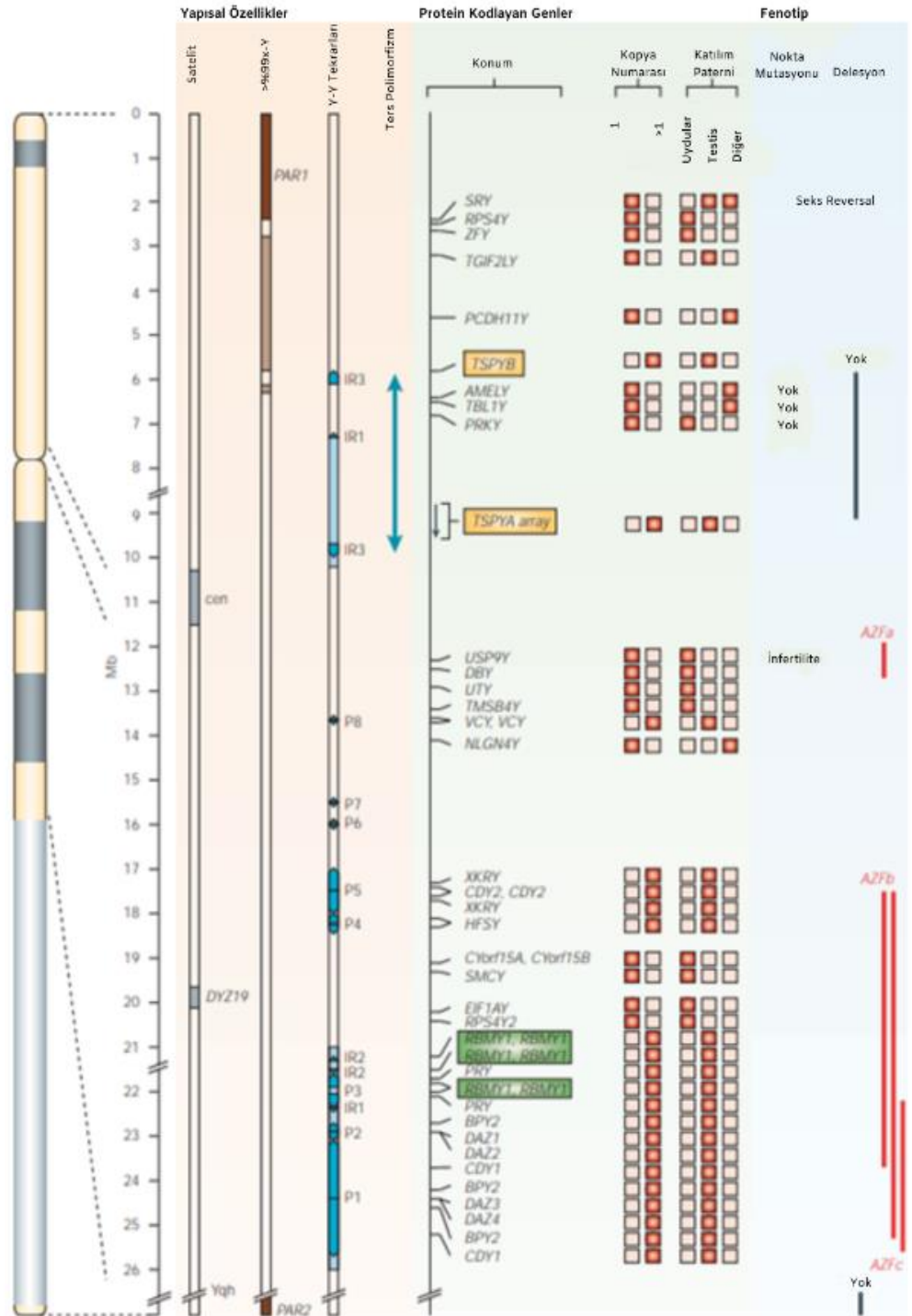
oligospermi görülmektedir (49). *AZFb*'de bulunan *RBM1* geni sadece testiste eksprese olur. Bu genin kodladığı RNA bağlayan proteinler RNA'nın paketlenmesinde, mRNA'nın transferinde ve alternative splicing aşamalarında görevli olduğu düşünülmektedir. Birçok kopyası olduğundan bu gen delesyonlardan etkilenmeyebilir (50). Bu genler haricinde aynı bölgede yer alan *IF-1A1*, *RPS4Y2*, *CYORF15A*, *CYORF15B*, *SMCY*, *XKRY*, *HSFY*, *PRY*, *CDY* ve *BPY2* genlerinin de testise özgü ekspresyon gösterdikleri bilinmektedir (48).

### **AZFc bölgesi**

*AZF* delesyonları arasında en sık görülen delesyon bölgesi olan ve azospermik ve ciddi oligospermik erkeklerde daha sık rastlanılan *AZFc* delesyonu, çok sayıda amplikon denen büyük tekrar dizileri içerir (51). Bu bölgede hiçbir testis dışında eksprese olmayan 21 gen bulunmaktadır. Bu genler arasında en iyi bilinenleri *DAZ*, *BPY2*, *CDY1* ve *TTY2* genleridir (48). Bu genlerden *DAZ* gen ailesi testise özgün olup RNA bağlayıcı proteinleri kodlar. *DAZ*, geç spermatid evresinde testise özgün mRNA'ların depolanma ve transferini kontrol eder (49). *DAZ* gen ailesinin erkek germ hücre dizisinin oluşması ve korunmasında birincil görevleri bulunmaktadır (52). *AZFc* bölgesi delesyonların en sık görüldüğü bölgedir ve bu bölge delesyonlarının varlığında matür sperm oluşumunun gerçekleştirilemediği gösterilmiştir. Yine de *AZFa* ve *AZFb* bölge delesyonlarının aksine *AZFc* delesyonlarının oldukça farklı klinikler gösterdiği ve özellikle parsiyel *AZFc* delesyonlarının hafif kliniklerle seyrettiği bildirilmektedir (53).

### **AZFd bölgesi**

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, *AZFb* ve *AZFc* arasında yerleşmiş bir *AZFd* bölgesini tanımlamaktadır. Bu çalışmalar, *AZFd* delesyonlarının, azospermiden normal sperm miktarına kadar değişkenlik gösteren fenotiplerle ilişkili olduğunu göstermiştir (54).



Şekil 6. Y Kromozomu Yapısı (42'den değiştirilerek alıntılanmıştır)

## 2.6. İnfertil Erkek Hastanın Değerlendirilmesi

Bütün hastalıklara yaklaşımda takip edilmesi gerektiği gibi infertilite incelemesine de üreme anamnezinin alınması ile başlanır. Anamnezde infertilite süresi ve önceki fertilizasyon durumu, adolesan ve puberte dönemi ve bu süreçte geçirilen hastalıklar ve operasyonlar, koitus sıklığı, özellikleri ve bulaşıcı hastalık taşıyıcılığı, kronik hastalıklar ve geçirilmiş cerrahi, çevresel toksinlere maruziyet ve ailedeki fertilite durumu sorgulanır. Genel bir fizik muayene yapılmalıdır. Genel beden yapısı, sekonder seks karakterlerinin gelişimi ve jinekomasti değerlendirilir. Genital muayene ve testis boyutlarının ölçümü, varikosel muayenesi yapılır. Epididim muayenesinde kistler saptanabilir (55).

Muayene sonrasında ilk istenecek test spermiyogramdır. Normal sonuçlarırsa tekrarına gerek yoktur. Anormal bir bulgu görülürse bir ay arayla tekrarı istenir. Hasta azospermik değilse fertil-infertil ayrımı yapılamaz. Sperm kalitesi düştükçe gebelik ihtimali azalır ancak yok olmaz (55).

Sperm sayı azlığı veya morfolojik bozukluk görüldüğünde hormonal inceleme yapılması gereklidir. Periferik kan testiyle FSH, testosteron ve östradiol hormonları öncelikli olarak değerlendirilir. Testosteron düzeyinin düşük bulunması durumunda LH ve prolaktine de bakılması gerekmektedir. Vazografi ve transrektal ultrasonografi obstrüktif azospermide lokalizasyonu belirlemek amacıyla uygulanabilir. Skrotal ultrasonografi ise kriptorşidizm ve hidrosel vakalarında tercih edilir (56).

Bütün bu incelemeler sonunda özellikle azospermi varlığında ileri inceleme olarak sperm-servikal mukus etkileşim testleri, akrozom reaksiyon testi, reaktif oksijen tayini, antisperm antikor tayini, gibi nadir testler istenebilir. Ancak özellikle en geç bu aşamadan sonra genetik testler zorunluluk teşkil etmektedir (55).

## 2.7. İnfertilite Etiolojisinde Genetik Faktörler

Erkeklerde infertilitenin başlıca genetik sebepleri; kromozom anomalileri, Y kromozomu mikrodelsyonları, X kromozomunda görülen bazı anomaliler ve bazı tek gen hastalıkları olarak verilebilir (68).

### 2.7.1. Kromozom Sayı Anomalileri

Klinefelter sendromu olarak da bilinen 47,XXY kromozomal anomalileri içinde erkeklerde en sık cinsiyet kromozomu anomalisidir. Görülme sıklığının 575-1000 canlı erkek doğumunda bir olduğu düşünülmektedir (69). Çocukluk çağında normal karyotipe sahip bireylerden morfolojik ayrımlarını yapmak pek mümkün değildir. Puberte sonrası görülebilecek tek bulgu testis boyutlarında küçüklük olabilir. Önikoid yapı, vücut kıllarının az olması gibi bulgular görülebilir. Küçük yaşlarda antropometrik ölçümleri normal seyreden vakalar yetişkin çağlarda uzun boylu olma eğilimindedir. Etkilenmiş bireylerin kol ve bacakları da uzundur. Testiküler volüm genellikle 10 ml'nin altındadır. Hastalar, az sayıdaki bildirilmiş vaka dışında infertildir. Sözel zihinsel kapasiteleri genelde ortalamın altında seyretmekle birlikte belirgin mental retardasyondan söz edilemez. Başta meme kanseri olmak üzere (200 kat) kanser riskinde genel olarak artış olduğu bildirilmektedir. Bazı otoimmün hastalıklar için de risk artmaktadır (69).

Klinefelter sendromu'na yol açan fazla X kromozomunun yaklaşık %53'ünün paternal mayoz I'de rekombinasyon sırasında gerçekleşen bir hatayla kromozomların ayrılamamasıyla oluştuğu düşünülmektedir. İlave X kromozomu, olguların %34'ünde ileri anne yaşına bağlı maternal mayoz I'deki, %9'unda maternal mayoz II'deki ayrılamama, %3 oranında da postzigotik mitotik hatalar sonucu oluştuğu gösterilmiştir (70). Olguların yaklaşık %15'inde mozaizm gözlenir ve hastalarda normal testis ve kısmi spermatogenez görülebildiği bildirilmiştir (71).

47,XXY kromozomal yapısındaki bireyler, belirgin fenotipik özellikleri olmadığından klinik ayrımları kolay yapılamaz fakat çoğu beklenen nihai boydan daha uzun boyludur. Yaklaşık 800-1000 canlı erkek doğumda bir görülmekte ve sadece %12'si tanı almaktadır. Paternal mayoz II'deki ayrılamama ilave Y kromozomunun nedenidir. Spermiyogramları normal ile azospermi arasında değişkenlik gösterse de gonadal mozaiklik sonucu fertil olmaları yüksektir. En öncül çalışmalar bu bireyleri zeka seviyeleri normal sınırlarda veya hafif altında, şiddete ve kriminal davranışlara eğilimli ve antisosyal olarak belirtmesine rağmen bu bulgulara artık şüpheyile yaklaşılmaktadır (60).

Genetik çeşitliliği oluşturmak için mayoz bölünme sırasında gerçekleşen rekombinasyonlar sırasında hata oluşma riski bulunmaktadır. Hatalı rekombinasyon sonucu bazı vakalarda maturasyon arresti ile azospermi oluşur. İnfertil erkeklerin

yaklaşık %10'unda, spermatogenetik arresti olan vakaların ise yarısında mayoz I profazının zigoten aşamasında rekombinasyon hatası bildirilmiştir (72).

### 2.7.2. Kromozom Yapı Anomalileri

46,XX erkek olgular: Kromozom analizinde 46,XX karyotipi saptanmasına rağmen erkek fenotipine sahip ve erkek birey olarak yetiştirilen ama sperm analizinde azoospermi tanısı konulan bu bireylerde paternal mayozda psödotozomal bölgedeki *SRY* geniyle X kromozomu arasında translokasyon sonucu oluşan derivatif X (*SRY* taşıyan) kromozomu taşıyan bireylerdir. Bu olgularda 47,XXY olgularında olduğu gibi fenotip beklenmektedir ve gonad testis yönünde farklılaşmaktadır. Ancak derivatif X kromozomu *AZF* bölgesini taşımadığından ve bu bölge de spermatogenez için gerekli olduğundan bu erkekler azospermiktir (73).

Robertsonian translokasyonlar akrosentrik kromozomların sentromerik bölgelerinden kaynaşması sonucu meydana gelir. Nükleolar Organize edici Bölgeler (NOR) akrosentrik kromozomların kısa kollarında lokalize olan RNA sentezinde rol alan bölgelerdir. Robertsonian translokasyonlarında kaybedilen NOR bölgeleri germ hücre apoptozuna ve infertiliteye neden olabilirler (74). Özellikle 13. ve 14. kromozomlar arasındaki Robertsonian translokasyonun infertil erkeklerde sıkça tespit edildiği gözlenmiştir. Bu durumun spermatogenezise müdahale mekanizması, resiprokal otozomal translokasyonların spermatogenezise müdahalesine benzer şekilde interkromozomal etki ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (96,97). Bireyde mevcut olan translokasyon veya yapısal yeniden düzenlenme sebebiyle, translokasyona ya da yeniden düzenlenmeye karışmayan herhangi bir kromozomun mayoz I sırasındaki ayrılamaması olayına “interkromozomal etki” denmektedir. Translokasyonlu kromozomlar XY bivalenti ile assosye olabilir (98). Mayoz I'in pakiten safhasında transloke kromozomlar, XY bivalenti ile asosye olabilir; interkromozomal etki meydana gelen bu heterosinaps formasyonu ile açıklanmaktadır. (99,100). Elektron mikroskop çalışmaları, oluşan heterosinaps oranlarının translokasyondan translokasyona farklı olduğunu göstermiş ve aynı translokasyonu taşıyanlarda bu oranın daha tutarlı olduğu görülerek, İKE'in translokasyon tipine bağlı olduğu fikrini öne sürmüşlerdir (101,102).

Hücrenin bölünmesinin metafaz safhasında iki kutba ayrılması gereken kromatidler normalde simetrik olarak dağılım gösterir. Ancak izokromozom durumunda kutuplardan birine sadece kısa koldaki kromatidler giderken, diğerine de sadece uzun koldaki kromatidler taşınır. Uzun koldaki kromatidler izokromozom q ile, kısa koldaki kromatidler izokromozom p ile simgelenir. i(Y)(q10) Y kromozomunun uzun kolunun izokromozomunu tanımlar ve bu nedenle normalde Y kromozomu p kolunda yer alan SRY geni i(Y)(q10) bireylerde bulunmaz. Fenotip kadın yönünde gelişim gösterir

İsodisentrik Y [idic(Y)] kromozomlarının oluşumunun, kromozom içi rekombinasyondan veya kromozom kırıkları sonrası kardeş kromatitler arasındaki füzyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. İzodisentrik Y kromozomlu hastalar, kadınlarda Turner sendromu, erkeklerde infertilite (90), ambigus genitalya, gonadal disgenez, kısa boy gibi çok çeşitli fenotipik belirtilere sahiptir. Fenotipler, izodikentrik Y kromozomlarının kırılması ve füzyonunun yerleri ile mozaizm oranlarına bağlıdır (91).

Bölünme sırasında kromozomun hem uzun hem de kısa kolunda kopmalar meydana gelip bunun neticesinde açıkta kalan uçların birbiri ile birleşmesi ile halka şeklini almasına ring (halka) kromozom anomalisi denir. Kopmanın ve dolayısı ile füzyonun meydana geldiği lokalizasyon çeşitli genetik materyal kaybı ile sonuçlanabilir. r(Y) kromozom anomalisinin özellikle AZF bölgesinde genetik materyal kaybına sebep olarak erkek infertilitesi ile ilişkisi olduğu bildirilmiştir (92).

Erkek cinsiyet gelişiminde etkin SRY haricinde etkin genler bulunmaktadır. Bunlardan 17q24.3'de yerleşik SOX9 geni SRY yokluğunda bile erkek fenotipinin oluşmasını sağlayabilmektedir. SOX9, SRY tarafından aktive edilerek testis maturasyonunu sağlar. Farklılaşmada rolü olan bir diğer gen ise 1p34.3'de yerleşik RSPO1 genidir ve fonksiyonu SOX9'u inhibe ederek kadınlarda over gelişmesini sağlar. Bazı 46,XX erkek fenotipli vakalarda RSPO1 geninde mutasyonlar saptanması, bu genin SOX9 genini baskılayamadığı için bu fenotipin oluştuğu bildirilmektedir (75).

Kromozom yapı bozuklukları içinde infertilite vakalarında Y mikrolelesyonları önemli bir yer tutmaktadır. Y kromozomu üzerinde tekrar dizileri oldukça büyük bir alan kapladıklarından delesyonlara sık rastlanır (76). Mikrolelesyonların en sık gözlemlendiği bölge Yq11 bölgesinde yerleşmiş bulunan ve spermatogenezde kritik görevi olan AZF bölgeleridir (77). İnfertilite sebeplerinin başlıca sebeplerinden olmasına rağmen, azoospermik olgularda %85 oranında delesyona rastlanmaz (51).

*AZF<sub>a</sub>* bölgesinde spermatogenez bozukluğuna yol açan, *USP9Y* ve *DBY* genlerini de kapsayan komplet delesyonlar 796 kb'lık bölgenin silinmesiyle oluşur. Bahsedilen bölgede daha önce de sözü geçen her ikisi de yaklaşık 10 kb uzunluğunda iki insan retrovirüs elementi arasında gerçekleşen rekombinasyon sonucu delesyonlar görülmektedir (78). Bu delesyonlar da bilindiği gibi seminifer tübüllerde germ hücre oluşumunu engelleyerek Sertoli only sendromu olarak bilinen kliniğe neden olabilir.

Komplet *AZF<sub>b</sub>* bölge delesyonlarının da nadir görüldüğü ancak spermatogenez sürecinin devamlılığı açısından oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Bu bölge delesyonları genelde matürasyon arresti sonucunda spermatogenezin durmasına ve azoospermi kliniğine yol açar (49).

*AZF<sub>c</sub>* bölgesi de homolog tandem tekrar bölgelerini bol miktarda içeren heterokromatin bölgesi olduğundan babadaki spermatogenezde mayoz evresinde dengesiz crossing over sonucu delesyonlar oluşabilmektedir. Bu durum *AZF<sub>c</sub>*'deki delesyon sıklığını açıklayabilmektedir (79). Yine de *AZF<sub>c</sub>* delesyonları oldukça sık görülmesine rağmen genelde kısmi delesyonları içermektedir ve çoğu vakada spermatogenezde bozulma görülmemektedir.

İnfertil erkeklerde 1, 3, 4, 6, 9 ve 10. kromozom inversiyonları daha sık gözlenmektedir (80). Mayotik eşleşme sorunu oluşturan 1. kromozomda gerçekleşen perisentrik inversiyonlar dışındakiler spermatogenezde genellikle bir problem oluşturmazlar. Dokuzuncu kromozom üzerindeki kimi genlerin, cinsel gelişim için Y kromozomu ile birlikte çalıştığı öngörülmektedir (81).

### 2.7.3. İnfertilite İlişkili Tek Gen Mutasyonları

Son zamanlardaki bazı çalışmalar diğer kromozomlarda bulunan bazı genlerin premayotik dönemde spermatogenez etkilediğini göstermektedir. Y kromozomunda olduğu gibi X kromozom mutasyonlarının da spermatogenez sorunlarına yol açabileceği ileri sürülmektedir (82).

Cinsel gelişimi etkilediği en iyi bilinen genlerden biri Xq12'de lokalize olan androjen reseptörü (*AR*) gen mutasyonları ambigus genitalya, seks reversal fenotiplere sebep olabilir. Bu gende bugüne kadar 300'den fazla mutasyon tanımlanmıştır (NM 313700). *AR* gen mutasyonlarının ağırlığına bağlı olarak infertilite bulguları da değişkenlik gösterebilmektedir. *AR* mutasyonlarının varlığında fetal dönemde Sertoli ve Leydig hücre maturasyonu gerçekleşmez. Erkek dış genitalyasının gelişimi için gerekli

olan testosteron ve dihidrotestosteron (DHT) düzeyleri *AR* gen mutasyonlarında azalır (83).

Kafkas ırkında sık görülen, otozomal resesif bir hastalık olan Kistik Fibrozis *CFTR* genindeki mutasyonlar sonucunda oluşur. Etkilenmiş erkeklerde Wolfian kanal obstrüksiyonu vardır. Spermatogenez, vakaların %90'ında normal olmasına rağmen bilateral konjenital vas deferans agenezisi (CBAVD) kaynaklı Obstrüktif Azospermi olguların %95'inde görülebilmektedir (84).

Primer silyer diskinezi olarak isimlendirilen hastalık nazopulmoner enfeksiyonlarla ve bazen situs inversusla seyreden epitelyal silyumların yapısının bozulduğu multigenik bir hastalıktır. Bu hastalıkta infertiliteye neden olan patoloji sperm flagellumunun da yapısının bozuk olmasına bağlı olarak spermatozooanın motilitesinin kaybolmasıdır. Bu hastalık, *DNAH5*, *DNAH11*, *CCDC39*, *DNAI1*, *CCDC40*, *CCDC103*, *SPAG1*, *ZMYND10*, *ARMC4*, *CCDC151* genleri başta olmak üzere çok sayıda gendeki mutasyonlarla ilişkilendirilmektedir (85).

*MTHFR* geni germ hücre nükleik asit metilasyonunda önemli bir rol üstlenmektedir. Anormal DNA metillenmesi de infertiliteye neden olabilmektedir (86). Bazı çalışmalar *MTHFR* promotor CpG adacıklarındaki hipermetilasyonun non obstrüktif azospermi vakalarında sık görülmesine rağmen kontrol gruplarında görülmediğini göstermiştir (87).

Bütün bu sayılan sebepler araştırıldığı ve kadın infertilitesi de dışlandığı halde infertil çiftlerin yaklaşık %6-27'sinde herhangi bir sebep bulunamamaktadır. Azospermik erkeklerin %13,3'ünde ise spermatogenez sorunlarının nedeni gösterilememiştir (88).

## **2.8. İnfertilitenin Araştırılmasında Kullanılan Sitogenetik ve Moleküler Genetik Analiz Yöntemleri**

İnfertiliteyle ilişkisi en iyi bilinen nedenler kromozom anomalileri ve Y mikrolelesyonlarıdır.

### **2.8.1. Karyotip Analizi**

Genetik sebepler içerisinde en sık infertilite sebebi olarak bilinen cinsiyet kromozom sayısı anomalisi Klinefelter sendromu'dur (57). Kromozomal patolojiler değişik toplumalarda infertil olgularda %10-15 gibi yüksek bir oranda saptanmaktadır ve

kromozomal anomaliler infertil erkeklerin ayırıcı tanısında oldukça önemli bir yer tutmaktadır (58). Kromozomal translokasyonlar ve inversiyonlar kırılma noktalarında genetik materyal kaybına neden olabilir. İnfertil erkeklerde translokasyonların normal popülasyona göre 4-10 kat daha sık olduğu bildirilmiştir (93,94). Yine i(Y)(q10), idic(Y), r(Y) anomalileri infertilite ile ilişkilendirilmiştir. Bu hastaların değerlendirilmesinde ilk istenmesi gereken test olarak kromozom analizi ön plana çıkmaktadır. Klinefelter sendromu ve tüm diğer sayısal ya da yapısal kromozom anomalilerinin araştırılması için periferik kanda karyotip analizleri rutin analizlerdendir. Periferik kan incelemelerinde mozaizmden şüphelenirse farklı bir dokunun incelenmesi amacıyla noninvaziv bir yöntem olarak yanak mukoza hücrelerinde uygun prob seçimi ile in-situ floresan tekniği de tanıya katkı sağlayabilir. Klasik sitogenetik analizler periferik kan örneklerinin lenfosit hücre kültürleri ile yapılabilir.

### **2.8.2. Y Mikrodelesyon Analizi**

Azospermik erkeklerde Y mikrodelesyonlarının sıklığı %13 olarak bildirilmektedir (59). Bu nedenle kromozom analizini takip eden test algoritmasında Y mikrodelesyon analizi oldukça önemli yer tutmaktadır. Özgün STS (Sequence tagged site) primerleri, Y kromozomu üzerindeki erkek özgün genleri PZR aracılığıyla çoğaltmak için kullanılır. Sık delesyonu görülen ve polimorfizm göstermeyen bölgelere özel STS primerleri tercih edilir (60). *AZFc* gibi sık delesyonun gözlemlendiği bölgelerde STS sayısı artırıldığı takdirde delesyon boyutu hakkında bilgi elde edilebilir. Y kromozomu taraması ile saptanan *AZF* bölgelerindeki mikrodelesyonların tip başına sıklık oranları *AZFa*'da %13.3, *AZFc*'de 20.3 ve *AZFc*'de %66.4 olarak bildirilmiştir (95).

### **2.8.3. Moleküler Genetik Analiz Yöntemleri**

#### **2.8.3.1. Sanger Dizileme Yöntemi**

Günümüzde DNA dizi analizinde sık kullanılan bir yöntem olan Sanger dizileme, 1974 yılında Sanger ile çalışma arkadaşlarının geliştirdiği zincir sonlanma yöntemidir (61). Mekanizması enzimatik DNA sentezine dayanır. Manuel (radyoaktif) işaretleme ve otomatik (fluoresan) işaretleme olmak üzere iki adet zincir sonlandırma reaksiyon türü vardır. Bu işlemde DNA polimerazın, dNTP'lerin (deoksiniükleotid trifosfat) ve ddNTP'lerin (dideoksiniükleotid trifosfat) nükleotid analoglarını zincire

ekleyerek fosfodiester bağı oluşturabilme özelliğinden yararlanılır. ddNTP'lerin 3'-hidroksil (OH-) grubu olmadığından fosfodiester bağı oluşamaz ve zincir elongasyonu gerçekleşmez (62). Bu yöntemin infertilite takibindeki önemi konjenital vas deferans yokluğu gibi en sık görülen obstrüktif azoospermi vakalarında hastalığın sebebi olarak *CFTR* gen mutasyonlarının taranmasında kullanılabilmesidir. Sanger dizileme şu anda altın standart olarak gösterilse de bazı kısıtlılıkları mevcuttur. Büyük delesyon/duplikasyonlar, rekombinasyon gibi DNA/RNA yapısına özgün nedenlerden kaynaklanan, analiz edilen bölgeler dışında bulunabilecek değişiklikleri (regülatör, promotör bölge, derin intronik bölge vb.) ve mozaizmi dışlamamaktadır. Bu nedenle dizileme yapılarak etiyolojisi aydınlatılmaya çalışılan hastaların bu tarz mutasyonlar da taşıyor olabileceği düşünülmelidir. Çok sayıda genin veya çok büyük genlerin dizilenmesi maliyetli ve iş gücü yüksek işlemler olmaktadır. Psödogeni bulunan genlerin dizilenmesinde de yanlış negatif sonuçlar elde edilebileceği göz ardı edilmemelidir.

#### **2.8.3.2. Yeni Nesil Dizileme**

Bu teknolojiye çok sayıda dizileme reaksiyonu paralel olarak gerçekleştirilebilmektedir. Sanger dizilemenin aksine dizileme sonucunun jel elektroforezinde değerlendirilmesine gerek olmamaktadır ve daha kısa fragman okuma esasına dayanmaktadır. Bu analizin yapılabilmesi adına çok sayıda algoritma geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Bu teknolojilerin avantajı üretilen bilgi miktarı ve hızıdır. Tüm genomun analizi mümkündür. Bunun sonucunda büyük miktarda veri elde edilir ancak analiz ve değerlendirme oldukça zordur. Yukarıda sayılan YND teknolojileri arasında ilk olarak bulunanı 2005 yılında 454 Life Sciences'tır. 454 Genome Sequencer adlı bu cihaz 110 baz çifti uzunluğunda yaklaşık 200.000 okuma yapabilme kapasitesine sahipti. 2006 yılında Solexa/Illumina, 2007 yılında ise Applied Biosystems tarafından Sequencing in Oligo Ligation Detection (SOLiD) piyasaya sürülmüştür. Çok uzun süre geçmeden Qiagen senteze dayalı sekanslama, Polony sekanslama ve tek molekül tespit sistemi (Helicos BioSciences) gibi farklı dizileme platformları piyasaya sürülmüştür. Helios BioSciences sisteminde DNA dizilemeden önce herhangi bir amplifikasyon olmaması nedeniyle bu teknoloji YND dizileme ile üçüncü jenerasyon dizileme arasında bir form olarak kabul edilmiştir. 2010 yılında Pacific Biosciences (PacBio) tarafından ortaya çıkarılan üçüncü jenerasyon dizilemede

ise tek molekül tespit sistemine ek olarak bu işlemin gerçek zamanlı yapıyor olmasıdır. Bu teknoloji sayesinde aynı sistemlerle tüm ekzom dizileme (TED) yapılabilir hale gelmiştir (63). TED sayesinde son yıllarda klinik tanısı bilinen ancak genetik alt yapısı tespit edilemeyen çok sayıda hastalığın mutasyonları ortaya çıkarılabilmektedir. Aynı zamanda aynı hastalığa ait farklı alttiplerin de sınıflandırılmaları ve etiyolojilerinin ortaya çıkarılması mümkün olabilmektedir. Genlerinin tümü tanımlanmış olan multigenik hastalıklarda YND metodu ile tanımlanmış olan bu genlerin değerlendirilmesi son yıllarda sıklıkla tercih edilen yaklaşımlardan biridir. Ancak TED cihazları analiz öncesinde oldukça büyük miktarlarda ham veri oluşturmaktadır. Bu verilerin analiz edilebilmesi için düzenli hale getirilmesi ve hizalanması gerekmektedir (64). Bunun için BWA, Novoalign ve Bowtie 2 gibi hizalandırma programları, germline ve somatik adlandırma için GATK, SAMtools, SNVMix, SomaticSniper gibi, kopya sayısı adlandırılması için ExomeCNV ve CONTRA gibi programların da kullanılması gerekmektedir. Hizalama programları kısa okuma dizilerini referans genom üzerinde haritalandırmaktadır (65). Hizalama işlemi tamamlandıktan sonra referans genomdan farklılıkların tanımlanması olan varyant adlandırma işlemine geçilir. Bu noktada kirlilikler yalancı pozitifliklere neden olabilir bu nedenle varyant kalitesi değerlendirildikten sonra varyant havuzuna atma işlemi yapılması gerekmektedir. Bu aşamadan sonra içerisinde binlerce varyant bulunan analize hazır bir veri elde edilmiş olur. Analiz sırasında hastalıklar ve varyantlar filtrelenerek istenilen hastalıklar taranabilir. Aile taraması yapılan vakalarda ebeveynlerde heterozigot, indeks vakada ise homozigot olarak görülen varyantların filtrelendirilmesi yapılabilmek germline mutasyonlar sonucu oluşan hastalıkların tanısı kolaylaştırılabilmektedir (66). Bu aşamadan sonra görülen varyantların patolojik olup olmadığının değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu da American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)'in 2015 yılında belirlediği rehber doğrultusunda yapılmaktadır. Bu rehberde, varyantın patojenik olup olmadığı değerlendirilirken taşıdığı özelliklere göre “çok güçlü”, “güçlü”, “orta” ve “destekleyici” patojenite kriterlerinden kaç tanesi ile uyumlu olduğu tespit edilir. Benzer şekilde benign olup olmadığı değerlendirilirken taşıdığı özelliklere göre “tek başına” “güçlü” ve “destekleyici” benign kriterlerden kaç tanesi ile uyumlu olduğu tespit edilir (67). Yeni nesil dizileme de bir dizileme yöntemi olduğundan tıpkı Sanger dizileme gibi büyük delesyon/duplikasyonlar, rekombinasyon gibi DNA/RNA yapısına özgün nedenlerden kaynaklanan, analiz edilen bölgeler dışında

bulunabilecek değişiklikleri (regülatör, promotör bölge, derin intronik bölge vb.) ve mozaizizmi dışlamamaktadır. Bunun dışında çalışılan bölgelerin kapsayıcılığının nadiren tam olması nedeniyle yalancı negatif sonuçların da sık görülebildiği göz önünde bulundurulmalıdır.

**Tablo 2. ACMG Varyant Patojenite Kriterleri**

| <b>Patojenitenin kanıtı</b> | <b>Kategori</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Çok güçlü</b>            | 1. (PVS1) Fonksiyon kaybettirici mutasyonlar                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Güçlü</b>                | 1. (PS1) Tanımlanmış aynı patojenik aminoasit değişikliğinin aynı kodondaki nükleotidin farklı bir nükleotide dönüşümünden kaynaklanması<br>2. (PS2) <i>De novo</i> varyant tanımlanması<br>3. (PS3) Fonksiyonel çalışmalar<br>4. (PS4) Hasta bireylerdeki varyant görülme sıklığının kontrol grubuna kıyasla önemli artış olması                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Orta</b>                 | 1. (PM1) Mutasyonun hot spot ya da iyi tanımlanmış kritik domainde yer alması                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|                             | 2. (PM2) Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project veya Exome Aggregation Consortium veritabanlarında kontrol gruplarda görülmemesi<br>3. (PM3) OR hastalıklar için patojenik varyantın trans olarak görülmesi<br>4. (PM4) Tekrar bölgeleri dışında çerçeve kayması mutasyonu veya stop kodonu oluşturarak protein uzunluğunun değişmesi<br>5. (PM5) Patojenik anlamsız mutasyon tespit edilen bölgede bir başka missense değişimin saptanması<br>6. (PM6) <i>De novo</i> olduğu düşünülen ama annenin/babanın çalışılmadığı durumlar                                                                                                                                                     |
| <b>Destekleyici</b>         | 1. (PP1) Hastalığa neden olan bir gen üzerinde aynı aile içerisinde birden çok etkilenmiş bireyde segregasyon olması<br>2. (PP2) Benign anlamsız değişiklik oranının düşük saptandığı bir gende missense varyant bulunması ve hastalık etyopatogenezinde missense varyantların yer alıyor olması<br>3. (PP3) <i>In silico</i> veri tabanlarında gen veya son protein ürününün hasar verici şekilde etkilendiğinin görülmesi<br>4. (PP4) Hastanın kliniğinin ya da aile öyküsünün genetik etiyolojiye sahip hastalıkla uyumlu olması<br>5. (PP5) Son dönemde güvenilir literatürde patojenik etkili olarak raporlanmış ancak kanıt için laboratuvarla bağımsız değerlendirme için uygun olmayan |

Tablo 3. ACMG Varyant Benign Kriterleri

| Benign kriterler    | Kategori                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tek başına</b>   | 1. (BA1) Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project veya Exome Aggregation Consortium veritabanlarında allel sıklığının %5'in üzerinde olması                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Güçlü</b>        | 1. (BS1) Allel sıklığının klinik için beklenenden yüksek saptanması<br>2. (BS2) Tam penetrans göstermesi beklenen hastalıklar için sağlıklı yetişkin bireylerde saptanması<br>3. (BS3) Fonksiyonel çalışmalarda protein fonksiyonu ve ürünün üzerinde hasar verici etkisinin görülememesi<br>4. (BS4) Aile bireyleri arasında etkilenen bireylerde segrege olmaması                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Destekleyici</b> | 1. (BP1) Hastalığın erken sonlanma mutasyonlarından kaynaklandığı durumlarda missense değişiklik tespiti<br>2. (BP2) Tam penetrans gösteren otozomal dominant hastalıkta patojenik değişimin trans konumunda görülmesi veya bir kalıtım paterninde cis durumunda patojenik değişimin görülmesi<br>3. (BP3) Tekrar bölgelerinde çerçeve içi delesyon veya insersiyon saptanması<br>4. (BP4) <i>In silico</i> veri tabanların gen veya protein ürününün hasar verici şekilde etkilendiğinin göstermemesi<br>5. (BP5) Moleküler temeli farklı bir hastada varyant gözlenmesi<br>6. (BP6) Son dönemde güvenilir literatürde benign olarak bildirilmiş ancak kanıt amacıyla için laboratuvarında değerlendirmesi uygun olmayan<br>7. (BP7) Sessiz değişimin splicing algoritmalarında konsensüs dizilerinde değişiklik yapmaması ve alternatif splice oluşturmaması ve nükleotidin korunmuşluk düzeyi yüksek bir bölgede bulunmaması |

Tablo 4. Varyantların sınıflandırılmasında kullanılan kriterlerin değerlendirilmesi

|                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Patojenik</b>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>i. 1 Çok güçlü (PVS1) VE <ul style="list-style-type: none"> <li>a) <math>\geq 1</math> Güçlü (PS1–PS4) YA DA</li> <li>b) <math>\geq 2</math> Orta (PM1–PM6) YA DA</li> <li>c) 1 Orta (PM1–PM6) ve 1 destekleyici (PP1–PP5) YA DA</li> <li>d) <math>\geq 2</math> Destekleyici (PP1–PP5)</li> </ul> </li> <li>ii. <math>\geq 2</math> Güçlü (PS1–PS4) YA DA</li> <li>iii. 1 Güçlü (PS1–PS4) VE <ul style="list-style-type: none"> <li>a) <math>\geq 3</math> Orta (PM1–PM6) YA DA</li> <li>b) 2 Orta (PM1–PM6) VE <math>\geq 2</math> destekleyici (PP1–PP5) YA DA</li> <li>c) 1 Orta (PM1–PM6) VE <math>\geq 4</math> destekleyici (PP1–PP5)</li> </ul> </li> </ul> |
| <b>Olası patojenik</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>i. 1 Çok güçlü (PVS1) VE 1 orta (PM1–PM6) YA DA</li> <li>ii. 1 Güçlü (PS1–PS4) VE 1–2 orta (PM1–PM6) YA DA</li> <li>iii. 1 Güçlü (PS1–PS4) VE <math>\geq 2</math> destekleyici (PP1–PP5) YA DA</li> <li>iv. <math>\geq 3</math> Orta (PM1–PM6) YA DA</li> <li>v. 2 Orta (PM1–PM6) VE <math>\geq 2</math> destekleyici (PP1–PP5) YA DA</li> <li>vi. 1 Orta (PM1–PM6) VE <math>\geq 4</math> destekleyici (PP1–PP5)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Benign</b>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>i. 1 Tek başına (BA1) YA DA</li> <li>ii. <math>\geq 2</math> Güçlü (BS1–BS4)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Olası Benign</b>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>i. 1 Güçlü (BS1–BS4) VE 1 destekleyici (BP1–BP7) YA DA</li> <li><math>\geq 2</math> Destekleyici (BP1–BP7)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Önemi bilinmeyen</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>i. Yukarıdaki kriterler karşılanamıyorsa YA DA</li> <li>ii. Benign ve patojenik kriterler arasında çelişki varsa</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu çalışmanın olgu grubunu İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 2014-2020 yılları arasında başvuran primer/sekonder infertilite ile tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan çiftlerden tanıya katkının artırılması için 34 anne adayına daha önceden Dr. Ezgi Gizem Berkay'ın doktora tezi kapsamında tüm ekzom dizi analizi yapılmış olup bu çiftler arasından etiyogenezi aydınlatılamayan baba adayları seçildi. Seçim için değerlendirilen çiftlerin dosya incelemesi, gebelik ve doğum öyküsü, eşler arasındaki akrabalık durumu ve etiyolojinin açıklanmasına yönelik yapılmış tetkikler incelenerek kriterlere uygun olan ve TED analizi için onam veren 10 erkek olgu belirlendi.

Araştırma amacıyla yapılacak moleküler analizler için, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 07.01.2020 tarih ve 28 sayılı yazı ile etik açıdan onam alındı. Çalışmaya ait bilgi aktarımı sonrası araştırmaya onam veren adaylara 'Gönüllü Olur Formu' imzalatıldı.

#### 3.2. Klinik Değerlendirmeler

Olguların anamnez bilgisine göre en az üç kuşak olacak şekilde ve gebelik öyküleri ön planda tutularak aile ağaçları çizildi. Olgulara ait geçirilmiş operasyon öyküsü (varikosel, hipospadias vb), karyotip analizi, Y mikrodelsyonu analizi, hormon paneli, tam kan sayımı, biyokimya testleri, yapılmış ise batin veya pelvik USG, koagülasyon faktörleri ve spermiyogram sonuçları ayrıntılı olarak not edildi.

#### 3.3. Kromozom Analizleri

İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD Sitogenetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen kromozom çalışmalarında, ilk aşamada olgulardan alınan heparinli periferik kan örnekleri ile lenfosit hücre kültürleri yapıldı. Kültür medyumunun içeriğinde RPMI 1640 Medium (100 ml), Fetal Calf Serum (15 ml), L-Glutamin (2 ml), fitohemaglutinin solüsyon (2 ml) ve penisilin/streptomisin (1 ml) bulunmaktaydı. Bu medyumdan 5 ml santrifüj tüplerine alınarak üzerine 5 damla (~0,25 ml) heparinli kan örneğinden ilave edildi. Fitohemaglutinin eklenerek hücreler bölünmek için uyarıldı ve hücrelerin bölünmeye devam edebilmeleri için 37°C'de 48 saat bekletildi. Sonrasında

devam etmekte olan kùltùrlere 0,1 ml timidin ilave edildi ve kùltùr sùresi 72 saate tamamlandı. Mitoz bölünme aşamasındaki hücrelere 0,1 ml kolşisin (kolşemid) ilave edilerek metafazda durduruldu. 2 saat sonrasında kùltùr sonlandırıldı ve hücreler toplandı. 0,075 M hipotonik KCl solüsyonu hücrelere eklendi ve ~20 dakika bekletildi. Santrifüj edilerek toplanan hücrelere, metil alkol ve glasiyel asetik asit ile 3:1 oranında hazırlanmış fiksatif solüsyonu eklendi ve yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Santrifüj sonrası hücreler pastör pipeti yardımıyla alındı ve lamaların üzerine damlatıldı. Lamalar 90°C'lik etüve alınarak 2,5 saat bekletildi. Ardından G-bantlama yapılarak kromozomların boyanması sağlandı. G-bantlama yönteminde, örnekler tripsin solüsyonunda ~30 saniye bekletildi ve sonrasında PBS ile yıkandı. Ardından Leishman solüsyonunda 1 dakika tutularak boyanması sağlandı ve distile su kullanılarak boyaların fazlası yıkandı ve ortam içerisindeki havada kurutuldu. Sonrasında lamaların üzeri lamel ile kapatıldı. Mikroskop aracılığı ile x100 kez büyütülerek incelenecek kısımlar konumlandırıldı ve Metasystem/Cytovision otomatik görüntüleme cihazı ile x250 kez büyütülerek her olgu için en az 20 metafaz olacak şekilde analiz yapıldı.

### 3.4. Moleküler Çalışmalar

#### Y Kromozomu AZF Mikrodelesyon Analizi

Olgulardan mor kapaklı K<sub>3</sub>EDTA'lı tüplere yaklaşık 2 ml periferik venöz tam kan alındı. Periferik kan örneklerinden izole edilen DNA ile Y kromozomu üzerindeki lokuslara (*AZFa*, *AZFb*, *AZFc*) ait mikrodelesyon analizi yapıldı.

Y kromozomu üzerinde 3 *AZF* mikrodelesyon bölgesinin analizi için, 6 (Sequence tagged site) *STS* marker hedeflendi. *AZFa* için sY84-sY86, *AZFb* için sY127-sY134 ve *AZFc* için sY254-sY255, *STS* leri kullanıldı. Hastalardan alınan DNA örnekleri multiplex PZR metodu ile değerlendirildi. (Simoni M et al. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions state of the art 2004).

İlk etapta hastalardan 2 cc'lik EDTA'lı tüplere periferik kan alındı. Genomik DNA izolasyonu Qiagen EZN1 DNA Blood 200 µl kiti (48) (katalog no: 951034) ile Qiagen firmasının otomatik DNA izolasyon cihazı EZN1 Advanced XL da yapıldı. Elde edilen DNA'lar 100ng/µl olacak şekilde dilüe edildi.

Delesyonların tespiti için Euro Clone Diagnostica chromosome Y microdeletions (katalog no: EDP003024) isimli ticari kit kullanıldı. Protokol olarak üreticinin önerdiği yol izlendi. PZR reaksiyonu için 2 farklı mix kullanıldı.

- Mix 1, *AZFa* için sY86, *AZFb* için sY127 ve *AZFc* için sY254 STS lerini ve kontrol olarak ZFX/ZFY bölgesini çoğaltırken;
- Mix 2, *AZFa* için sY84, *AZFb* için sY134 ve *AZFc* için sY255 STS lerini ve yine kontrol olarak ZFX/ZFY bölgelerini çoğalttı.

Her hasta DNA sı her iki mix ile muamele edildi. Her reaksiyon için negatif kontrol ve kadın kontrol kullanıldı. Her örnek için ticari kitten 20 µl mix ve 5 µl DNA örneği birlikte toplamda 25 µl hacimde olacak şekilde multiplex PZR metodu çoğaltıldı. Reaksiyon Bio-Rad termal cyclers cihazında gerçekleştirildi.

**Tablo 5. PZR kondüsyonları**

| Zaman     | Sıcaklık °C | Döngü |
|-----------|-------------|-------|
| 10 dakika | 94          | 1     |
| 60 saniye | 94          | 30    |
| 30 saniye | 60          |       |
| 60 saniye | 72          |       |
| 5 dakika  | 72          | 1     |
| ∞         | 4           | ∞     |

PZR ürünleri etidyum bromürün eklenmiş olduğu %3 lük agaroz jelde 80 volt 350 amperde 70-80 dakika boyunca yürütüldü ve Gel Doc XR+ Imager UV transilluminatörde görüntülenerek değerlendirildi.

### **DNA İzolasyonu ve Kalitesinin Değerlendirilmesi**

Olgulardan mor kapaklı K<sub>3</sub>EDTA'lı tüplere yaklaşık 2 ml periferik venöz tam kan alındı. Her olgu için 400 µl kan örneğinden MagPurix® 12 cihazı ile, MagPurix® Blood DNA Extraction Kit 200 (OP02001) kullanılarak prosedüre uygun şekilde DNA izolasyonu yapıldı. MagPurix® teknolojisi, manyetik boncuklar kullanarak materyallerden nükleik asitlerin çıkarılmasını sağlayan otomatik bir sistemdir. DNA saflaştırma aşaması parçalama, bağlama, yıkama ve elüsyon aşamalarını içerir.

Genomik DNA'ların izolasyonunun ardından, her biri için Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c cihazı aracılığıyla spektrofometrik olarak yoğunluk (ng/μl) ve saflık derecesi absorpsiyon ölçümleri ile kalite kontrol çalışmaları gerçekleştirildi. Ölçüm sonuçlarına göre DNA konsantrasyonlarının gerekli olan >50 ng/μl üzerinde ve A260/A280 oranlarının da 1,8-2,0 aralığında olduğu tespit edildi (Tablo 6).

**Tablo 6. Olgulardan ve Eşlerden Elde Edilen DNA Konsantrasyonları**

| Olgu no    | ng/μl | 260/280 | 260/230 | eş DNA | ng/μl | 260/280 | 260/230 |
|------------|-------|---------|---------|--------|-------|---------|---------|
| 1aşar      | 59,6  | 1,77    | 1,92    | +      | 74    | 1,74    | 1,72    |
| 2diler     | 67    | 1,79    | 2,01    | +      | 94,7  | 1,82    | 1,93    |
| 3çoşaran   | 66,7  | 1,76    | 1,94    | +      | 38,4  | 1,82    | 1,79    |
| 4toksoy    | 75,3  | 1,8     | 1,9     | +      | 56,7  | 1,8     | 2,2     |
| 5özkan     | 76,6  | 1,78    | 1,9     | +      | 38,1  | 1,75    | 1,55    |
| 6şen       | 70,3  | 1,83    | 1,97    | +      | 68,5  | 1,75    | 1,87    |
| 7karyemez  | 145,7 | 1,8     | 1,92    | +      | 107,6 | 1,81    | 2,06    |
| 8karagöz   | 69,1  | 1,75    | 2,35    | +      | 67,4  | 1,8     | 2,55    |
| 9kanbur    | 80,3  | 1,85    | 1,82    | +      | 50    | 1,78    | 1,67    |
| 10gündemir | 62    | 1,77    | 2,01    | +      | 119,6 | 1,76    | 1,97    |

### WES Analizi Islak Laboratuvar Çalışmaları

10 olgudan elde edilen genomik DNA'ların kaliteleri değerlendirilip yeni nesil dizileme işlemleri için uygun oldukları tespit edildikten sonra, proje kapsamında maddi koşullar göz önüne alınarak TED ıslak laboratuvar çalışmalarının hizmet alımı ile gerçekleştirilmesi kararlaştırıldığından, materyaller ilgili merkezlere uygun koşullarda kargo ile gönderildi.

Engin Tıp aracılığı ile Next Genetic Center'da (NGC) TWIST Core Exome kiti ve MGI DNBSEQ-G400 cihazı kullanılarak dizileme işlemi yapılmıştır. NGC'den elde edilen Islak laboratuvar çalışma basamakları aşağıda sıralanmıştır.

### Fragmantasyon

İstenen sayıda capture reaksiyonu için her örnek 50 ng saflaştırılmış gDNA içermelidir. Qubit dsDNA Broad Range Quantitation Assay kiti ile gDNA'ların

konsantrasyonu belirlendi. gDNA örnekleri su ile 5 ng /  $\mu$ L'ye seyreltildi ve seyreltilmiş her gDNA örneğinden 10  $\mu$ L, 0.2-mL'lik PCR tüplere alındı. Buz üzerinde 1.5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpünde “Enzimatik Fragmentasyon Mixi” tablo 7’ye göre hazırlanıp nazikçe pipetleyerek iyice karıştırıldı.

**Tablo 7. Enzimatik Fragmentasyon Mixi**

| REAGENT                  | VOLUME     |
|--------------------------|------------|
| dH <sub>2</sub> O        | 25 $\mu$ L |
| 10x Fragmentation Buffer | 5 $\mu$ L  |
| 5x Fragmentation Enzyme  | 10 $\mu$ L |
| Total                    | 40 $\mu$ L |

Her 10  $\mu$ L gDNA örneğine 40  $\mu$ L “Enzimatik Fragmentasyon Mixi” eklenerek nazik pipetleme ile iyice karıştırıldı. Termal cyclers Tablo 8’deki koşullarla programlandı.

**Tablo 8. Enzimatik Fragmentasyon Mixi**

| STEP          | TEMPERATURE | TIME  |
|---------------|-------------|-------|
| Pre-chill     | 4 °C        | HOLD  |
| Fragmentation | 32 °C       | 22 dk |
| Inactivation  | 65 °C       | 30 dk |
| Hold          | 4 °C        | HOLD  |

Örnekler önceden soğutulmuş termal cyclere yerleştirilerek termal cycler programı başlatıldı.

### Adaptörlerin Ligasyonu

“Ligasyon Mixi” tablo 9’da gösterilen miktarlardaki gibi buz üzerinde 1.5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı. Her örneğe 44,5  $\mu$ L mix eklenerek nazikçe karıştırıldı.

**Tablo 9. Ligasyon Mixi**

| <b>Reagent</b>      | <b>Volume</b> |
|---------------------|---------------|
| Sample              | 50 µl         |
| H2O                 | 14,5 µl       |
| DNA Ligation Buffer | 20 µl         |
| DNA Ligation Mix    | 10 µl         |
| MGI Adaptor         | 5,5 µl        |
| <b>TOTAL</b>        | <b>50 µl</b>  |

Ligasyon reaksiyonu 20 ° C'de bir termal cyclerda 15 dakika inkübe edildi.

#### **Pürifikasyon**

DNA Pürifikasyon Beadleri homojenleşene kadar vortekslendi. Her bir örneğe 80 µL (0.8x) DNA Pürifikasyon Beadleri eklenerek iyice karıştırıldı. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Örnekler manyetik bir stand üzerine yerleştirilerek 1 dakika bekletildi. Böylece DNA Pürifikasyon Beadlerinin bir pelet oluşturması sağlandı. Şeffaf süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Bead pelet 200 µL taze hazırlanmış %80 etanol ile yıkandı, 1 dakika inkübe edildi, ardından etanol uzaklaştırıldı. Etanol ile yıkama işlemi bir kere daha tekrarlandı. Manyetik stand üzerindeki bead peleti kuruyana kadar bekletildi. Peletin tamamı kuruduktan sonra tüpler manyetik standdan çıkartıldı ve her tüpe 17 µL su ile birlikte homojenize edildi. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Tüpler manyetik standı yerleştirildi ve 3 dakika boyunca veya boncuk yapıları tamamen topaklanana kadar bekletildi. Temiz 0.2 mL'lik bir tüpe "Ligated Indexed Kütüphaneleri" içeren 15 µL berrak süpernatant aktarıldı.

#### **Pre-Capture PCR Amplifikasyonu**

PCR Mixi, tablo 10'da belirtilen miktarlardaki gibi buz üzerinde 1.5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı. Nazikçe pipetaj yapılarak tablo 11'de belirtilen PCR programına koyuldu.

**Tablo 10. PCR Mixi Miktarları**

| Reagent                     | Volume (µl) / Per Sample |
|-----------------------------|--------------------------|
| Sample                      | 15 µl                    |
| KAPA HiFi HotStart ReadyMix | 25 µl                    |
| MGI Primer Mix              | 10 µl                    |

**Tablo 11. PCR Programı**

| STEP            | TEMPERATURE | TIME  | NUMBER OF CYCLES |
|-----------------|-------------|-------|------------------|
| Initialization  | 98 ° C      | 45 sn | 1                |
| Denaturation    | 98 ° C      | 15 sn | 10               |
| Annealing       | 60 ° C      | 30 sn |                  |
| Extension       | 72 ° C      | 30 sn |                  |
| Final Extension | 72 ° C      | 1 dk  | 1                |
| Final HOLD      | 4 ° C       | HOLD  | -                |

### Pürifikasyon

DNA Pürifikasyon Beadleri homojenleşene kadar vortekslendi. PCR tüplerine 50 µL (1x) homojenize DNA Pürifikasyon Beadleri eklenerek vorteksle iyice karıştırıldı. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Şeffaf süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Bead pelet 200 µL taze hazırlanmış %80 etanol ile yıkandı, 1 dakika inkübe edildikten sonra etanol uzaklaştırıldı. Etanol ile yıkama işlemi bir kere daha tekrarlandı. Peletin tamamı kuruduktan sonra tüpler manyetik standdan çıkarılarak her tüp 22 µL su ile homojenize edildi. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Tüpler manyetik standda yerleştirilerek 3 dakika boyunca veya boncuk yapıları tamamen toplanana kadar bekletildi. Temiz 0.2 mL'lik bir tüpe berrak süpernatandan 20 µL aktarıldı. Pürifiye edilmiş DNA'ların konsantrasyonları Qubit dsDNA Broad Range Quantitation Assay kiti kullanılarak ölçüldü.

### Pool Oluşturma

Her hibridizasyon reaksiyonu, eşit poolda toplanarak yapılan toplam 1500 ng indekslenmiş kütüphaneye ihtiyaç duyar. Bu nedenle örneklerin her birinden 187,5 ng/μL olacak şekilde 8’li poollar oluşturuldu.

### Pre-Capture Konsantrasyon

Her poolun üzerine hacminin 1.5 katı kadar SPRI bead eklendi. Örnekleri manyetik stand üzerinde 1 dk bekleterek oluşan şeffaf süpernatant kısım atıldı. Bead pelet 200 μL taze hazırlanmış %80 etanol ile yıkandı; 1 dakika inkübe edildikten sonra etanol uzaklaştırıldı. Etanol ile yıkama işlemi bir kere daha tekrarlandı. Peletin tamamı kuruduktan sonra tüpler manyetik standdan çıkarılır ve her tüp 20 μL, önceden 65 ° C de ısıtılmış “Hibridizasyon Mixi” ile homojenize edildi.

### Hibridizasyon

Tablo 12’de verilen miktarlara göre hibridizasyon reaksiyonu hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon tablo 13’deki koşullardaki termal cyler programında 16 saat inkübe edildi.

**Tablo 12. Hibridizasyon Reaksiyonu için Miktarlar**

| Reagent                      | Volume       |
|------------------------------|--------------|
| Dried Indexed Library Sample | 20 μl        |
| Hybridization Mix            |              |
| Twist Universal Blocker Mix  | 2 μl         |
| Core Exome Probes v1.3       | 4 μl         |
| Refseq Prob                  | 4 μl         |
| Blocker Solition             | 5 μl         |
| dH2O                         | 6 μl         |
| <b>TOTAL</b>                 | <b>41 μl</b> |

**Tablo 13. İnkübe Koşulları**

| TEMPERATURE | TIME |
|-------------|------|
| 95 ° C      | 5 dk |
| 70 ° C      | HOLD |

**Hibridize Hedeflerin Streptavidin ile Bağlanması****Streptavidin Binding Beadlerin Yıkınması**

Streptavidin Binding Beadler homojenleşene kadar vortekslendi. Temiz bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne 100 µL Streptavidin Binding Beadleri eklendi. Tüplere 200 µL Binding Buffer eklendi ve homojenleşene kadar pipetleyerek karıştırıldı. Tüpleri manyetik bir standda 1 dakika bekletildi. Şeffaf süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Binding Buffer ile yıkama işlemi 2 kere daha tekrarlandı. Üç yıkamanın ardından son 200 µL Bağlama Tamponu eklenerek beadler homojenleşene kadar vortekslenerek tekrar süspansiyon haline getirildi.

**Hedeflerin Streptavidine Bağlanması**

16 saatlik hibridizasyon tamamlandıktan sonra, her bir örnek 200 µL yıkanmış Streptavidin ile mix edildi. Mix oda sıcaklığında 30 dk nutator üzerinde homojenize edildi. Streptavidin Binding Bead ile Hibridizasyon Reaksiyonunu içeren tüpler manyetik bir standda yerleştirilerek 1 dk bekletildi. Şeffaf süpernatantı uzaklaştırıldı. Tüpler manyetik standdan çıkarılarak 200 µL Wash Buffer 1 ile homojenize edildi. Tüm hacim 1.5 mL'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Tüpler manyetik bir standda yerleştirilerek 1 dk bekletildi. Şeffaf süpernatantı uzaklaştırıldı. Tüpler manyetik standdan çıkarılarak 48 ° C'de önceden ısıtılmış 200 µL Wash Buffer 2 ile homojenize edildi. Tüpler 48 ° C'de 5 dakika inkübe edildi. Tüpler manyetik bir standda yerleştirilerek 1 dakika bekletildi. Şeffaf süpernatant uzaklaştırıldı. Wash Buffer 1 ve Wash Buffer 2 ile yıkama işlemi 2 kere daha tekrarlandı. Son yıkamadan sonra tüpler manyetik standdan çıkartılarak beadler 45 µL su ile homojenize edildi.

**Post-Capture PCR**

Tablo 14'deki koşullar ile bir termal cycler programlanır.

**Tablo 14. Termal Cycler Koşulları**

| STEP            | TEMPERATURE | TIME  | CYCLE |
|-----------------|-------------|-------|-------|
| Intialization   | 98 ° C      | 45 sn | 1     |
| Denaturation    | 98 ° C      | 15 sn | 8     |
| Annealing       | 60 ° C      | 30 sn |       |
| Extension       | 72 ° C      | 30 sn |       |
| Final Extension | 72 ° C      | 1 dk  | 1     |
| Final Hold      | 4 ° C       | HOLD  | -     |

Streptavidin Binding Bead içeren örneklerden 22.5 µL yeni bir 0.2 mL PCR tüpüne aktarıldı. Tablo 15’de belirtien hacimlerde mix oluşturularak termal cycler programına koyuldu.

**Tablo 15. Mix Hacimleri**

| Reagent                          | Volume       |
|----------------------------------|--------------|
| Streptavidin Binding Bead Slurry | 22,5 µl      |
| KAPA HiFi HotStart Ready Mix     | 25 µl        |
| MGI Primer Mix                   | 2,5 µl       |
| <b>TOTAL</b>                     | <b>50 µl</b> |

Termal cycler programı tamamlandığında, tekrar pürifikasyon aşamasıyla devam edildi. DNA Pürifikasyon Beadlerini homojenleşene kadar vortekslendi. PCR numunesine 50 µL (1x) homojenize DNA Pürifikasyon Beadlerini eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Şeffaf süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Bead peleti 200 µL taze hazırlanmış %80 etanol ile yıkandı, 1 dakika inkübe edildi, sonra etanol uzaklaştırıldı. Etanol ile yıkama işlemi bir kere daha tekrarlandı. Tüpler manyetik standdan çıkarıldı ve beadlerin üzerine 32 µL su eklenerek pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Tüpler manyetik standda yerleştirildi ve 3 dakika boyunca veya boncuk yapıları tamamen topaklanana kadar bekletildi. Temiz 0.2 mL’lik bir tüpe 30 µL berrak süpernatant aktarıldı. Pürifiye edilmiş

DNA'ların konsantrasyonları Qubit dsDNA Broad Range Quantitation Assay kiti kullanılarak ölçüldü.

### Denütrasyon

PCR ürün boyutuna göre, 1 pmol PCR ürünü yeni bir 0.2 mL PCR tüpüne aktarıldı. TE Buffer ile toplam 48 µL'lik bir hacim oluşturuldu. Örnekler 95 ° C'de 3 dk termal cyclerda denatüre edildikten hemen sonra 2 dakika buz üzerinde bekletildi.

### Tek İplikli Sirkülerizasyon

Tablo 16'da belirtilen miktarlarda sirkülerizasyon mixi hazırlanarak her örneğe 12.1 µL eklendi.

**Tablo 16. Sirkülerizasyon Mixi Miktarları**

| COMPONENTS       | VOLUME  |
|------------------|---------|
| Splint Buffer    | 11.6 µL |
| DNA Rapid Ligase | 0.5 µL  |
| Total            | 12.1 µL |

Mix eklenen örnekler tablo 17'de belirtilen termal cycler programında inkübe edildi.

**Tablo 17. Cycler Programı**

| TEMPERATURE | TIME  |
|-------------|-------|
| Heated lit  | On    |
| 37 ° C      | 30 dk |
| 4 ° C       | Hold  |

### Enzimatik Digestiyon

Buz üzerinde tablo 18'deki enzimatik digestion mixi hazırlandı.

**Tablo 18. Digestiyon Mixi**

| COMPONENTS       | VOLUME |
|------------------|--------|
| Digestion Buffer | 1.4 µL |
| Digeston Enzyme  | 2.6 µL |
| Total            | 4 µL   |

Hazırlanan mix her bir örneğe 4 µL dağıtılarak tablo 19'daki termal cycler programında inkübe edildi.

**Tablo 19. Thermal Cycler Programı**

| TEMPERATURE | TIME  |
|-------------|-------|
| Heated lit  | On    |
| 37 ° C      | 30 dk |
| 4 ° C       | Hold  |

İnkübasyonun ardından her bir tüpe 7.5 µL Digestion Stop Buffer eklendi.

### Pürifikasyon

DNA Clean Beadleri oda ısısında 30 dakika bekletilerek kullanmadan önce iyice homojenize olana kadar vortekslendi. 170 µL DNA Clean Beadi Enzimatik Digestion ürününe aktararak pipetajla homojenize edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Tüpler manyetik standda alınarak 2-5 dakika kadar bekletildi. Berraklaşan süpernatant uzaklaştırıldı. Manyetik stand üzerindeki tüplere 500 µL taze hazırlanmış % 80 etanol eklenerek 30 sn inkübe edildi. Süpernatantı dikkatlice uzaklaştırıldı. Etanol ile yıkama işlemi bir kere daha tekrarlandı. Manyetik standdaki pelet tamamen kuruduktan sonra tüp manyetik standdan ayrılarak beadler 32 µL TE Tampon ile homojenize edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Tüpler tekrar manyetik standda yerleştirilerek berraklaşan süpernatanttan 30 µL temiz bir tüpe aktarıldı. Pürifiye edilmiş DNA'ların konsantrasyonları Qubit ssDNA kiti kullanılarak ölçüldü.

### DNB Yapma

Her DNB reaksiyonu için 40 fmol ssDNA library kullanılarak tablo 20'ye göre DNB reaksiyon mixi 1 hazırlandı.

**Tablo 20. DNB Reaksiyonu Mix-1 Miktarları**

| COMPONENT       | VOLUME              |
|-----------------|---------------------|
| ssDNA libraries | V $\mu$ L (40 fmol) |
| Low TE Buffer   | 20-V $\mu$ L        |
| Make DNB Buffer | 20 $\mu$ L          |
| Total           | 40 $\mu$ L          |

Hazırlanan DNB Reaksiyonu tablo 21'de belirtilen termal cycler programına konuldu.

**Tablo 21. Thermal Cycler Programı**

| TEMPERATURE         | TIME |
|---------------------|------|
| Heated lid (105 °C) | On   |
| 95 °C               | 1 dk |
| 65 °C               | 1 dk |
| 40 °C               | 1 dk |
| 4 °C                | Hold |

PCR programı tamamlandıktan sonra tablo 22'ye göre DNB reaksiyon mixi 2 hazırlandı.

**Tablo 22. DNB Reaksiyon Mix-2 Miktarları**

| COMPONENT                   | VOLUME     |
|-----------------------------|------------|
| Make DNB Enzyme I           | 40 $\mu$ L |
| Make DNB Enzyme Mix II (LC) | 4 $\mu$ L  |

Hazırlanan mix DNB reaksiyonuna eklenerek tablo 23’de belirtilen termal cyclor programına konuldu.

**Tablo 23. Termal Cyclor Programı**

| TEMPERATURE        | TIME  |
|--------------------|-------|
| Heated lid (35 °C) | On    |
| 30 °C              | 25 dk |
| 4 °C               | Hold  |

Reaksiyonun ardından her tüpe 20 µL Stop DNB Reaksiyon Bufferı eklendi. Wide bore ile 5-8 kez pipetaj yapıldı. DNB tamamlandıktan sonra, DNB'yi ölçmek için Qubit® ssDNA Kiti kullanıldı. Sıralama, DNB konsantrasyonunun 8 ng / µL'nin üzerinde olmasını gerektirir. Konsantrasyonun 8 ng / µL'den düşük olmadığı teyid edildi.

#### **DNB Yükleme**

Yeni bir 0.2 mL’lik PCR tüpüne tablo 24’de belirtilen componentler ile DNB karışımı hazırlanarak flow celle yükleme yapıldı.

**Tablo 24. Componentler**

| COMPONENT                   | VOLUME  |
|-----------------------------|---------|
| DNB Load Buffer II          | 8 µL    |
| Make DNB Enzyme Miz II (LC) | 0.25 µL |
| DNB                         | 25 µL   |

Örnekler MGI DNBSEQ-G400 platformunda dizilenmiştir. Çalışma sonunda elde edilen hedef ekzom bölgeleri için ortalama 65x okuma derinliği elde edilmiştir. Elde edilen veriler biyoinformatik iş akışı ile analiz edilip varyant listesi çıkarılmıştır.

### 3.5. Biyoinformatik Varyant Analizi

Dizileme işlemleri sonucunda elde edilen veriler ham data halinde (.fastq) ve excel formatında düzenlenmiş olarak tarafımıza ulaştırıldıktan sonra biyoinformatik analizlere geçildi. Varyantların incelenmesinde ACMG'nin (American College of Medical Genetics and Genomics) yayınlamış olduğu varyant analiz kriterleri göz önüne alındı (147). Biyoinformatik analizlere başlamadan önce literatür taraması ve veri madenciliği yapılarak çalışmalar kapsamında bildirilmiş erkek infertilitesi ve tekrarlayan gebelik kayıpları (TGK) ile ilişkilendirilmiş veya aday genlerin listesi oluşturuldu. Analizler sonucu erkek infertilitesi ve TGK ile ilişkisi olabileceği düşünülen varyantlar değerlendirilirken yapılan ilk filtrelemede, bu liste kapsamındaki gen varyantları incelendi. İkinci filtrelemede en az üç in siliko tahmin araçlarına göre patojenik veya olası patojenik özellik taşıyan tüm genlerdeki değişimler değerlendirmeye alındı. Son olarak The Jackson Laboratory verilerinin de bulunduğu Mouse Genome Informatics (MGI) incelenerek fareler üzerinde yapılan “hedef genler” ile gebelik kaybına sebep olabileceği düşünülen lethal genler değerlendirildi. Tüm incelenen varyantın okuma derinliğinin en az 20x olmasına dikkat edildi. Saptanan varyantlardan polimorfizmi dışlamak adına tüm filtrelemelerde toplum sıklığı  $<0,01$  değerinde olanlar değerlendirmeye alındı.

#### 3.5.1. Varyant Patojenitesinin Belirlenmesi

Tüm dünyada birçok laboratuvar ve tanı merkezi tarafından da tercih edilen sınıflamada varyantların olası fenotip etkisi açısından gruplanması ve kriterleri Tablo 25’de gösterildi.

**Tablo 25. Varyantların Fenotipe Olası Etkileri Açısından Sınıflandırma Kriterleri**

|                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Patojenik<br>(Pathogenic)                                 | <ol style="list-style-type: none"> <li>1 çok güçlü (PVS1) ve <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\geq 1</math> güçlü (PS1-PS4) veya</li> <li>- <math>\geq 2</math> orta (PM1-PM6) veya</li> <li>- 1 orta (PM1-PM6) ve 1 destekleyici (PP1-PP5) veya</li> <li>- <math>\geq 2</math> destekleyici (PP1-PP5)</li> </ul> </li> <li><math>\geq 2</math> güçlü (PS1-PS4)</li> <li>1 güçlü (PS1-PS4) ve <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\geq 3</math> orta (PM1-PM6) veya</li> <li>- 2 orta (PM1-PM6) ve <math>\geq 2</math> destekleyici (PP1-PP5) veya</li> <li>- 1 orta (PM1-PM6) ve <math>\geq 4</math> destekleyici (PP1-PP5)</li> </ul> </li> </ol> |
| Olası patojenik<br>(Likely pathogenic)                    | <ol style="list-style-type: none"> <li>1 çok güçlü (PVS1) ve 1 orta (PM1-PM6) veya</li> <li>1 güçlü (PS1-PS4) ve 1-2 orta (PM1-PM6) veya</li> <li>1 güçlü (PS1-PS4) ve <math>\geq 2</math> destekleyici (PP1-PP5) veya</li> <li><math>\geq 3</math> orta (PM1-PM6) veya</li> <li>2 orta (PM1-PM6) ve <math>\geq 2</math> destekleyici (PP1-PP5)</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Önemi bilinmeyen<br>(VUS: variant uncertain significance) | <ol style="list-style-type: none"> <li>Kriterlerin hiçbirini karşılamayan veya</li> <li>Zararsız veya patojenik özellikleri karşılayan kriterlerin tutarsızlığı</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Olası zararsız<br>(Likely benign)                         | <ol style="list-style-type: none"> <li>1 güçlü (BS1-BS4) ve 1 destekleyici (BP1-BP7) veya</li> <li><math>\geq 2</math> destekleyici (BP1-BP7)</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Zararsız<br>(Benign)                                      | <ol style="list-style-type: none"> <li>1 tek başına (BA1) veya</li> <li><math>\geq 2</math> güçlü (BS1-BS4)</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

YND sonucunda elde edilen tüm veriler “Sophia Genetics, Data Driven Medicine (DDM)” ve “egenemaster” yazılım programları aracılığıyla yapılan filtrelemelerle değerlendirildi. Elde edilen tüm varyantlar *in silico* veri tabanlarında [OMIM, Varsome, Clinvar, Pubmed, 1000 Genomes Project, Exome Aggregation Consortium (ExAC), Ensemble, PolyPhen, Mutation Taster, dbNSFP, dbSNP, NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), gnomad] her biri birbirinden bağımsız olarak değerlendirilerek ACMG kriterlerine göre sınıflandırıldı. Mevcut klinik durum ile ilişkili olma ihtimali olan varyantlar tez kapsamında tartışmaya dahil edildi.

### 3.6. Primer Tasarımı

Varyant konfirmasyonu ve segregasyonu için bölgeye spesifik primerler tasarlama aşamasında, primerlerdeki oligonükleotidlerin tekrarlayan dizi bölgesinde

olmamasına, herhangi bir polimorfizm içermemesine ve içermesi kaçınılmaz ise toplum sıklığının %1'in altında olmasına, primerlerin DNA'ya bağlanma ısılarının birbirine yakın olmasına (~2-5°C farklılık), aralarında çift bağ yapısı bulunan A-T nükleotitlerinin sayısının üçlü bağ yapısı bulunan C-G sayısında olabildiğince eşit olmasına önem verildi. Ensembl veri tabanından alınan veriler ile tasarlanan primerler, USCS Genome Browser in silico PZR aracı ile bağlanma ısıları, dizi uzunlukları ve spesifitesi açısından kontrol edildi. Tez kapsamında tasarlanmış olan primer dizilerine ait bilgiler Tablo 26'da verildi.

Tablo 26. Primer Dizileri

| Gen ve Ekzon    | Primer dizisi                    | Primer bağlanma ısıları (°C) | PZR ürün boyu |
|-----------------|----------------------------------|------------------------------|---------------|
| <i>CD36-F10</i> | 5' –CATGCTTGGCTATTGAGTT – 3'     | 53.9                         | 403 bç        |
| <i>CD36-R10</i> | 5' –GGTATGGACTGTGCTACTGA– 3'     | 53.6                         |               |
| <i>HGD-F2</i>   | 5'-GTT CAG GGA GGT TAC AGT GT-3' | 60                           | 1364 bç       |
| <i>HGD-R2</i>   | 5'-CAG GAT CTT GGG CAG CTC T-3'  | 60                           |               |

### 3.7. Ekzonik Bölgelerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Primer tasarlanan olgulara ait DNA'lar ve tasarlanan primerler ile termal döngü cihazı kullanılarak PZR çalışması yapıldı. Her bir çalışma için kullanılan malzemeler, final konsantrasyonları ve PZR çalışma koşulları Tablo 27 ve 28'de verildi.

**Tablo 27. PZR Çalışması için Kullanılan Malzemeler ve Final Konsantrasyonları**

| Malzemeler                                                                      | Final konsantrasyonları                  |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 10X (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> tampon solüsyonu (Hibrogen) | 1X                                       |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> (Hibrogen)                                              | 2 mM                                     |
| 25 µM dNTP (Invitrogen 100 mM dNTP setten hazırlanmış)                          | 0.2 mM                                   |
| 2 µM İleri ve geri primerler (Sentebiolab, Sentromer)                           | 0,2 µM                                   |
| 500 U (5 U/µl) Taq polimeraz enzimi (Hibrogen)                                  | 0,1-0,2 µl                               |
| DMSO (Biomatik)                                                                 | % 0-10 olacak şekilde (G-C oranına göre) |
| Distile su                                                                      | 25 µl'ye tamamlanacak şekilde            |
| DNA                                                                             | 100-200 ng/g                             |
| Final konsantrasyon                                                             | 25 µl                                    |

**Tablo 28. PZR Çalışma Koşulları**

|              |                       |                      |           |
|--------------|-----------------------|----------------------|-----------|
| Denatürasyon | 94°C                  | 10 dakika            | x1 döngü  |
| Denatürasyon | 94°C                  | 30 saniye            | x10 döngü |
| Bağlanma     | Primer bağlanma ısısı | 30 saniye            |           |
| Uzama        | 72°C                  | 45 saniye-1,5 dakika |           |
| Denatürasyon | 94°C                  | 30 saniye            | x30 döngü |
| Bağlanma     | Primer bağlanma ısısı | 30 saniye            |           |
| Uzama        | 72°C                  | 45 saniye-1,5 dakika |           |
| Uzama        | 72°C                  | 10 dakika            | x1 döngü  |
| Bekleme      | 4°C                   | 1 saat               | x1 döngü  |
| Duraklama    | 10°C                  | ∞                    | x1 döngü  |

Bant boylarının hedeflenen bç ile aynı olduğunun gösterilmesi için, 5 µl PZR ürünü ile 2 µl Gel Red boyası karıştırılarak 1X TBE tamponu içindeki %2'lik agaroz jele yüklendi. 120 Voltta, 50 bç'lik merdiven işaretleyicisi (Sigma) ile 30 dk yürütülerek PZR ürünleri boyutlarına göre ayrıldı. Elektroforez işlemi sonrasında

jeldeki ürünler Vilber Lourmat Infinity cihazı aracılığıyla ultraviyole ışık altında görüntülendi. Özgünlüğü doğrulanmış PZR ürünlerinin saflaştırılması Thermo Scientific Exonuclease-I 20 U/μl ve Alkaline Phosphatase 1 U/μl ile protokole uygun şekilde yapıldı.

### 3.8. Sanger Dizi Analizi ile Varyantın İncelenmesi ve Biyoinformatik Analizi

#### 3.8.1. Dizi PCR Çalışması

Tablo 29’da verilmiş olan malzemeler ile final hacim 10 μl olacak şekilde karışım hazırlandı ve 96 örneklik plak (The Applied Biosystems, MicroAmp Optical 96-well reaction plate) üzerindeki her kuyucukta bir örnek olacak şekilde örnekler aktarıldı ve Tablo 30’da belirtilen koşullar ile termal döngü cihazında çalışma gerçekleştirildi.

**Tablo 29. Dizi**

|                                           |
|-------------------------------------------|
| 5X BigDye dizileme tamponu                |
| BigDye Terminator v3.1 reaksiyon karışımı |
| Primer (ileri/geri veya her ikisi)        |
| Saflaştırılmış PZR ürünü                  |
| Distile su                                |

**PZR Çalışması için  
Kullanılan  
Malzemeler**

**Tablo 30. Dizi PZR Çalışma Protokolü**

|              |      |           |           |
|--------------|------|-----------|-----------|
| Denatürasyon | 96°C | 10 saniye | x25 döngü |
| Bağlanma     | 50°C | 5 saniye  |           |
| Uzama        | 60°C | 4 dakika  |           |
| Sonlanma     | 4°C  | ∞         | x1 döngü  |

Dizi PZR işlemi sonrasında arta kalan primer ve diğer reaktiflerin temizlenmesi amacıyla plaktaki her bir kuyucuğa 1 μl 125 mM EDTA, 1 μl 3M sodyum asetat ve 25 μl %100 etanol eklenerek plak alüminyum koruyucu yapışkan bantla kapatıldı ve 15 dakika oda ısısında tutuldu, ardından 3.810 rpm’de 45 dakika santrifüj yapıldı. Bu işlemten sonra plak üzerindeki bant kaldırıldı, kuyucuk ağızları üstte kalacak şekilde

ters çevrildi, 1.100 rpm’de 30 saniye santrifüj yapıldı. Sonrasında kuyucuklara 35 µl %70’lik etanol ilave edildi. Plak tekrar bant ile kapatıldı ve 3.460 rpm’de 20 dakika santrifüj işlemi tekrarlandı. Plağın üstü tekrar açıldı ve 1.170 rpm’de 60 saniye santrifüj edildi. Ardından kuyucuklara tek tek 10 µl HiDi formamid (Highly Deionized formamid, enjeksiyon tampon çözeltisi) ilave edildi. Plaktaki ürünler 95°C’de 5 dakika denatüre edildikten sonra 2 dakika buz üzerinde bekletildi ve The Applied Biosystems (ABI) 3500 Genetic Analyzer cihazına yüklendi.

### 3.8.2. Kapiller Elektroferez

Kapiller elektroforez (KE) sistemi ile çalışan ABI-3500 cihazı 8 kapillerli dizi sistemi ve polimeri içerir, DNA sekanslama ve/veya fragman analizi imkanı sunar. Elektrokinetik bir ayırım yaparak, yüksek voltaj ile akım verilir, moleküllere elektrik yüklenerek hareketlenmeleri sağlanır ve anot ucunda yerleştirilmiş hassas sensörler ile izlenirler. Çok az miktarda ürün kullanılarak hassas ve otomatize bir sistem ile diziler okunur.

Plak cihaza yerleştirildikten sonra bilgisayar aracılığı ile daha önceden kalibre edilmiş boya seti seçildi ve Tablo 31’deki koşullar ile yürütme yapıldı.

**Tablo 31. Kapiller Elektroferez Yürütme Koşulları**

|                    |             |
|--------------------|-------------|
| Yürütme voltajı    | 13,4 kVolt  |
| Ön yürütme voltajı | 15 kVolt    |
| Enjeksiyon voltajı | 1,6 kVolt   |
| Yürütme süresi     | 2,52 saniye |
| Ön yürütme süresi  | 180 saniye  |
| Enjeksiyon zamanı  | 8 saniye    |
| Veri gecikmesi     | 250 saniye  |

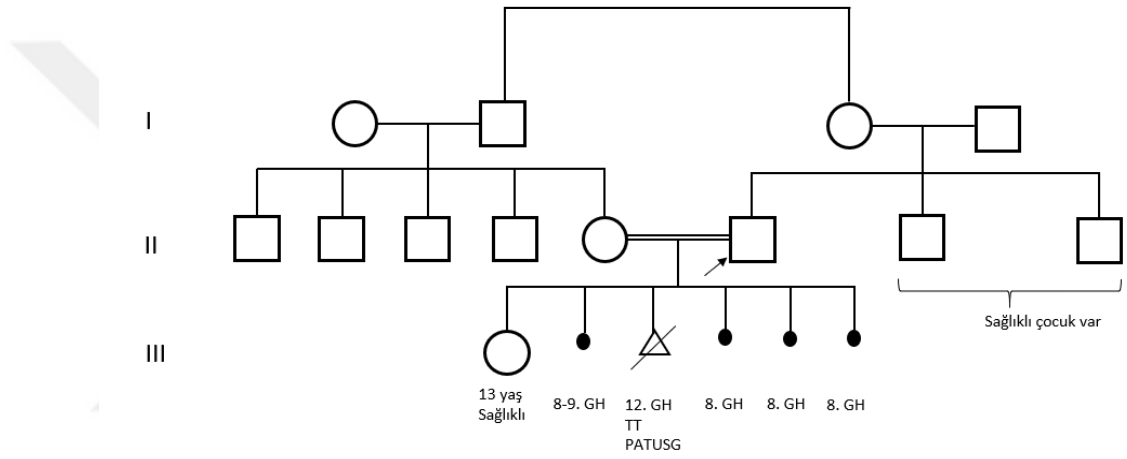
### 3.8.3. Dizileme Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Biyoinformatik Analizi

Kapiller elektroforez ile yürütülen ürünlerden elde edilen dizi verileri Seq Scape v3 ve Chromas v2.6.6 analiz programları ile bilgisayar ortamında incelendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Olgu 1

Olguya ait aile ağacı (Şekil 7), klinik ve laboratuvar bulguları (Tablo 32), TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları (Sophia DDM) (Tablo 33) ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar (Tablo 34) aşağıda gösterildi.



Şekil 7. Olgu 1'e Ait Aile Ağacı

**Tablo 32. Olgu 1'e Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları**

|                                |                                                                                                                                |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Olgunun yaşı                   | 43                                                                                                                             |
| Maternal yaş                   | 39                                                                                                                             |
| Gebelik öyküsü                 | G6P1TT1A4                                                                                                                      |
| Akrabalık                      | Eşiyle 1.° kuzen                                                                                                               |
| Ailede benzer öykü             | -                                                                                                                              |
| Gebeliğin oluşma şekli         | Spontan                                                                                                                        |
| Gebelik kaybı GH'sı            | A1, 3-5: 8-9. GH, TT1: 12. GH                                                                                                  |
| Fetal/abortus karyotip analizi | G3(TT1): 46,--, A4(G6): 46, --                                                                                                 |
| Geç fetal kayıp                | -                                                                                                                              |
| Fetal USG bulgusu              | G3(TT1): Üst ve alt ekstremitelerde distal kemikler yok, akrania, tek umbilikal arter, omfalosel, polidaktili, nazal kemik yok |
| Ek hastalık öyküsü             | -                                                                                                                              |
| Varsa ilaç tedavisi            | -                                                                                                                              |
| Ek klinik bulgu                | -                                                                                                                              |
| Kromozom Analizi               | 46,XY                                                                                                                          |
| Y MD Analizi                   | AZFa,b,c (+)<br>Delesyon (-)                                                                                                   |

**Tablo 33. Olgu 1'e Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları**

|                                          |        |
|------------------------------------------|--------|
| Toplam varyant sayısı                    | 29.482 |
| Zararsız/Olası zararsız varyant sayısı   | 25.217 |
| VUS varyant sayısı                       | 3.746  |
| Patojenik/Olası patojenik varyant sayısı | 519    |
| Homozigot varyant sayısı                 | 11.193 |
| Heterozigot varyant sayısı               | 18.289 |

**Tablo 34. Olgu 1'e Ait TED verisinin biyoinformatik analizinde gözlenen klinik ilişkili olabilecek varyantlar**

| Gen<br>(Transkript)            | Kalıtım<br>modeli | Varyant                             | dbSNP<br>Allel frekansı<br>(gnomAD) | Veritabanlarına göre<br>varyant sınıflaması          |
|--------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <i>TTC21B</i><br>(NM_024753.4) | OD, OR            | c.1546C>T<br>p.Q516X<br>heterozigot | rs779134983<br>0,00002389           | patojenik (ACMG,<br>DANN, EIGEN,<br>MutationTaster ) |
| <i>TSSK2</i><br>(NM_053006.4)  | ?                 | c.637T>C<br>p.S213P<br>heterozigot  | rs150218881<br>0.0007957            | Olası patojenik<br>(ACMG, Polyphen,<br>DANN)         |

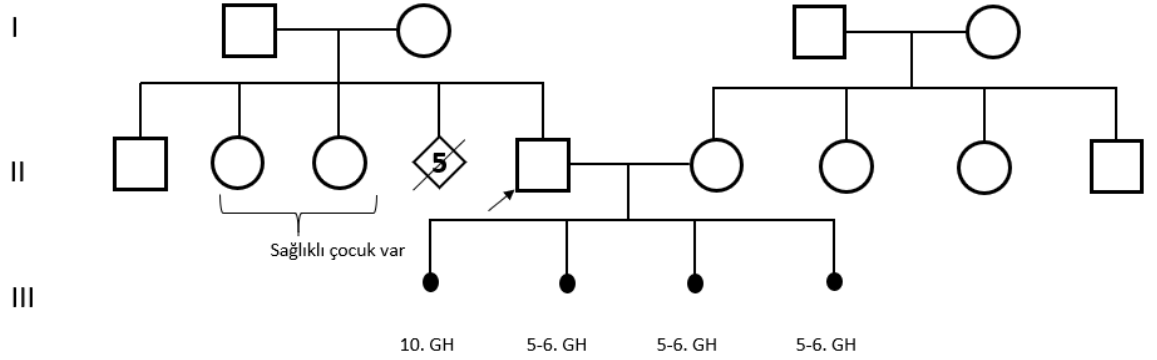
**Sonuç:** Olgu 1’de yapılan analiz sonucunda veritabanları sınıflandırmalarına göre anlamlı olabilecek 2 varyant; siliyopatiler ile ilişkilendirilmiş *TTC21B* geninde patojenik bir variant ve serin treonin kinaz ailesinden *TSSK2* geninde olası patojenik olarak sınıflandırılmış bir varyant saptandı. Olgunun eşinde daha önce yapılmış olan TED analizinde *TTC21B* varyantını heterozigot olarak taşıdığı, olgumuzda saptanan *TSSK2* genindeki 2. varyantı ise taşımadığı belirlendi. Bu çalışmada eşinin *CFTR*, *MCM8*, *NEK4*, *ALPPL2* ve *SHBG* genlerinde varyantlar saptanmış ancak olgumuzda bu varyantlar ya da bu genlerde herhangi bir varyant saptanmadı.

**Genetik yaklaşım ve danışma:** Olgu 1’de saptanan ve infertilite ile ilişkili aday genler arasında yer alan *TSSK2* varyantının öncelikle olgunun sağlıklı çocukları olan her iki erkek kardeşinde de aynı varyant açısından analiz yapılması ve bu sonuçlara göre aile ağacının genişletilmesi planlandı.

*TTC21B* genindeki varyant olgu ve eşinde heterozigot olarak bulunduğundan olası tüm gebeliklerde %25 hastalık, %50 taşıyıcılık riski olduğu yönünde aile bilgilendirildi. Diğer aile bireylerinden özellikle akraba evliliği yapanlar ve çocuk sahibi olmak isteyenlerin aynı varyant açısından değerlendirilmesi önerildi.

#### 4.2. Olgu 2

Olguya ait aile ağacı (Şekil 8), klinik ve laboratuvar bulguları (Tablo 35), TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları (Sophia DDM) (Tablo 36) ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar (Tablo 37) aşağıda gösterildi.



Şekil 8. Olgu 2'ye Ait Aile Ağacı

Tablo 35. Olgu 2'ye Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları

|                                |                              |
|--------------------------------|------------------------------|
| Olgunun yaşı                   | 28                           |
| Maternal yaş                   | 26                           |
| Gebelik öyküsü                 | G4A4                         |
| Akrabalık                      | yok                          |
| Ailede benzer öykü             | -                            |
| Gebeliğin oluşma şekli         | Spontan                      |
| Gebelik kaybı GH'sı            | A1: 10. GH, A2-4: 5-6. GH    |
| Fetal/abortus karyotip analizi | -                            |
| Geç fetal kayıp                | -                            |
| Fetal USG bulgusu              | -                            |
| Ek hastalık öyküsü             | -                            |
| Varsa ilaç tedavisi            | -                            |
| Ek klinik bulgu                | -                            |
| Kromozom Analizi               | 46,XY                        |
| Y MD Analizi                   | AZFa,b,c (+)<br>Delesyon (-) |

**Tablo 36. Olgu 2'ye Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları**

|                                          |        |
|------------------------------------------|--------|
| Toplam varyant sayısı                    | 29.317 |
| Zararsız/Olası zararsız varyant sayısı   | 24.880 |
| VUS varyant sayısı                       | 3.882  |
| Patojenik/Olası patojenik varyant sayısı | 555    |
| Homozigot varyant sayısı                 | 10.973 |
| Heterozigot varyant sayısı               | 18.344 |

**Tablo 37. Olgu 2'ye Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar**

| Gen<br>(Transkript)          | Kalıtım<br>modeli | Varyant                                        | dbSNP<br>Allel frekansı<br>(gnomAD) | Veritabanlarına<br>göre varyant<br>sınıflaması                         |
|------------------------------|-------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <i>HGD</i><br>(NM_000187.3)  | OR                | c.175delA<br>p.(Ser59Alafs*52)<br>heterozigot  | rs397515517<br>0.0001194            | patojenik (Clinvar,<br>dbSNP, ACMG,<br>DANN, EIGEN,<br>MutationTaster) |
| <i>CD36</i><br>(NM_000072.3) | OR, ?,            | c.949dupA<br>p.(Ile317Asnfs*36)<br>heterozigot | rs70961716<br>0.0001077             | patojenik<br>(Polyphen, GERP,<br>ACMG)                                 |

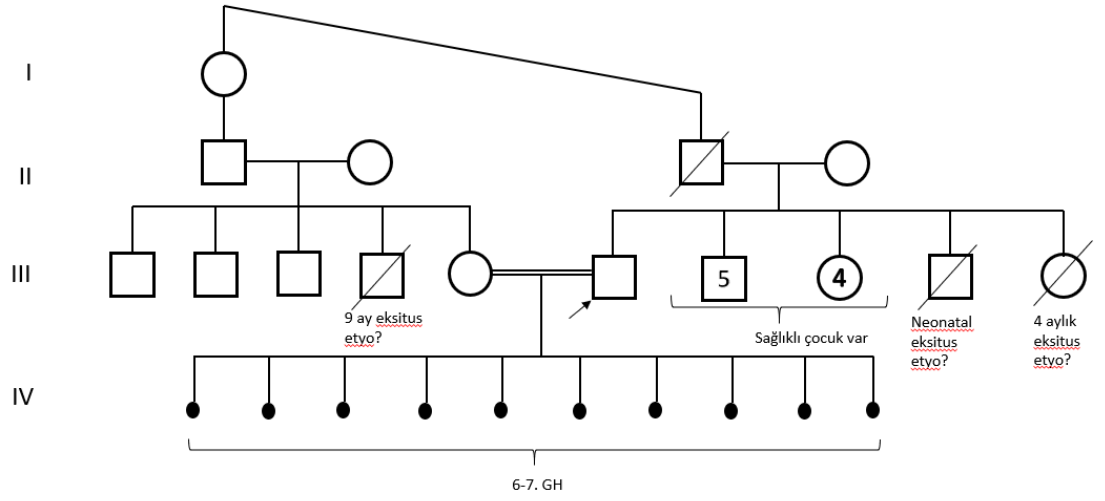
**Sonuç:** Olgu 2'de yapılan analiz sonucunda metabolik yollarda görevli ve Alkaptonüri hastalığı ile ilişkili *HGD* geninde ve immün fonksiyonlarda görevli *CD36* geninde patojenik olarak değerlendirilen iki varyant bulundu. Olgunun eşinde daha önce yapılmış olan TED analizinde olgumuzda saptanan *HGD* ve *CD36* genlerine ait herhangi bir varyantı taşımadığı belirlendi. Bu çalışmada eşinin *FLT1* ve *DYNC2H1* genlerinde varyantlar saptanmış ancak olgumuzda bu varyantlar ya da bu genlerde herhangi bir varyant saptanmadı.

**Genetik yaklaşım ve danışma:** Olgu 2'de OR kalıtılan alkaptonüri hastalığı ile ilişkili *HGD* geninde saptanan heterozigot varyantın çocuk sahibi olmak isteyen diğer aile bireylerde de taşıyıcılık açısından taranması önerildi.

#### 4.3. Olgu 3

Olguya ait aile ağacı (Şekil 9), klinik ve laboratuvar bulguları (Tablo 38), TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları (Sophia DDM) (Tablo

39) ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar (Tablo 40) aşağıda gösterildi.



Şekil 9. Olgu 3'e Ait Aile Ağacı

Tablo 38. Olgu 3'e Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları

|                                |                                          |
|--------------------------------|------------------------------------------|
| Olgunun yaşı                   | 50                                       |
| Maternal yaş                   | 44                                       |
| Gebelik öyküsü                 | G10A10                                   |
| Akrabalık                      | Eşiyle 1,5.° kuzen                       |
| Ailede benzer öykü             | -                                        |
| Gebeliğin oluşma şekli         | Spontan                                  |
| Gebelik kaybı GH'sı            | A1-A10: 6-7. GH                          |
| Fetal/abortus karyotip analizi | -                                        |
| Geç fetal kayıp                | -                                        |
| Fetal USG bulgusu              | -                                        |
| Ek hastalık öyküsü             | -                                        |
| Varsa ilaç tedavisi            | -                                        |
| Ek klinik bulgu                | -                                        |
| Kromozom Analizi               | 46,XY                                    |
| Y MD Analizi                   | AZF <sub>a,b,c</sub> (+)<br>Delesyon (-) |

**Tablo 39. Olgu 3'e Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları**

|                                          |        |
|------------------------------------------|--------|
| Toplam varyant sayısı                    | 29.617 |
| Zararsız/Olası zararsız varyant sayısı   | 25.167 |
| VUS varyant sayısı                       | 3.928  |
| Patojenik/Olası patojenik varyant sayısı | 522    |
| Homozigot varyant sayısı                 | 10.973 |
| Heterozigot varyant sayısı               | 18.344 |

**Tablo 40. Olgu 3'e Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar**

| Gen<br>(Transkript)          | Kalıtım<br>modeli | Varyant                                  | dbSNP<br>Allel frekansı<br>(gnomAD) | Veritabanlarına<br>göre varyant<br>sınıflaması     |
|------------------------------|-------------------|------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <i>DMD</i><br>(NM_000109.3)  | XLR               | c.5236G>A<br>p.(Glu1746Lys)<br>hemizigot | rs1359089046<br>0.000005455         | patojenik (ACMG,<br>DANN, SIFT,<br>MutationTaster) |
| <i>CFTR</i><br>(NM_000492.2) | OD, OR            | c.2657+5G>A<br>heterozigot               | rs80224560<br>0.00007555            | patojenik (Clinvar,<br>ACMG)                       |

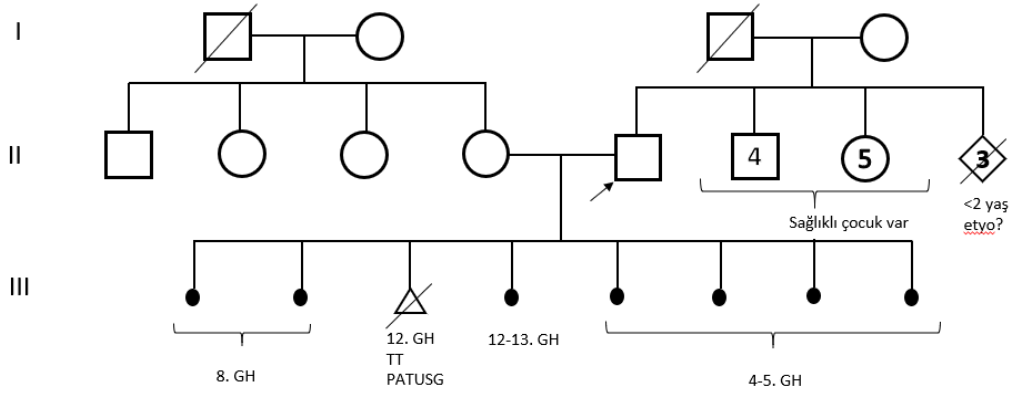
**Sonuç:** Olgu 3'de yapılan analiz sonucunda veritabanlarında patojenik olarak sınıflandırılan 2 varyant saptandı. Bunlardan biri iskelet kası membran proteini kodlayan *DMD* geninde ve diğeri kistik fibroz ilişkili *CFTR* geninde idi. Olgunun eşinde daha önce yapılmış olan TED analizinde olgumuzda saptanan *DMD* ve *CFTR* genlerine ait herhangi bir varyantı taşımadığı belirlendi. Bu çalışmada eşinin *ACE*, *AGFR*, *GLI3*, *MMP10* ve *SLC27A3* genlerinde varyantlar saptanmış ancak olgumuzda bu varyantlar ya da bu genlerde herhangi bir varyant saptanmadı.

**Genetik yaklaşım ve danışma:** *DMD* geninde saptanan hemizigot varyant Becker Musküler Distrofisi ile ilişkili olup ilk aşamada bu varyantın olgunun annesinde araştırılması, gerekirse çalışmanın kardeşlerine genişletilmesi planlandı. Aynı varyantın saptanması durumunda kardeşlerinin çocuklarının da taranması planlandı. Olgudaki heterozigot patojenik *CFTR* geni varyantı için olgunun eşinde herhangi bir varyant taşımadığı önceki çalışmadan bilinmekteydi. Olgunun ailesinde her iki gen ve varyantlar için taşıyıcılıklarının araştırılması önerildi. Taşıyıcılık saptanan bireylerin

eşlerinin de incelenerek yüksek risk olan çiftlerin gebeliklerinde prenatal tanı/PGD seçeneği olabileceği belirtildi.

#### 4.4. Olgu 4

Olguya ait aile ağacı (Şekil 10), klinik ve laboratuvar bulguları (Tablo 41), TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları (egenemaster) (Tablo 42) ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar (Tablo 43) aşağıda gösterildi.



Şekil 10. Olgu 4'e Ait Aile Ağacı

**Tablo 41. Olgu 4'e Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları**

|                                |                                                        |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Olgunun yaşı                   | 40                                                     |
| Maternal yaş                   | 36                                                     |
| Gebelik öyküsü                 | G8A7TT1                                                |
| Akrabalık                      | yok                                                    |
| Ailede benzer öykü             | -                                                      |
| Gebeliğin oluşma şekli         | Spontan                                                |
| Gebelik kaybı GH'sı            | A1-2: 8. GH, A3: 12-13. GH, A4-A7: 4-5. GH, TT1: 12 GH |
| Fetal/abortus karyotip analizi | TT1(G3): 46,--, A3:46,--, A8: 46,--                    |
| Geç fetal kayıp                | -                                                      |
| Fetal USG bulgusu              | G3(TT1): lomber spina bifida, kifoskolyoz              |
| Ek hastalık öyküsü             | -                                                      |
| Varsa ilaç tedavisi            | -                                                      |
| Ek klinik bulgu                | ciltte kuruluk, kızarıklık                             |
| Kromozom Analizi               | 46,XY                                                  |
| Y MD Analizi                   | AZF <sub>a,b,c</sub> (+)<br>Delesyon (-)               |

**Tablo 42. Olgu 4'e Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları**

|                                          |        |
|------------------------------------------|--------|
| Toplam varyant sayısı                    | 29.567 |
| Zararsız/Olası zararsız varyant sayısı   | 24.019 |
| VUS varyant sayısı                       | 5.179  |
| Patojenik/Olası patojenik varyant sayısı | 369    |
| Homozigot varyant sayısı                 | 10.782 |
| Heterozigot varyant sayısı               | 18.785 |

**Tablo 43. Olgu 4’e Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar**

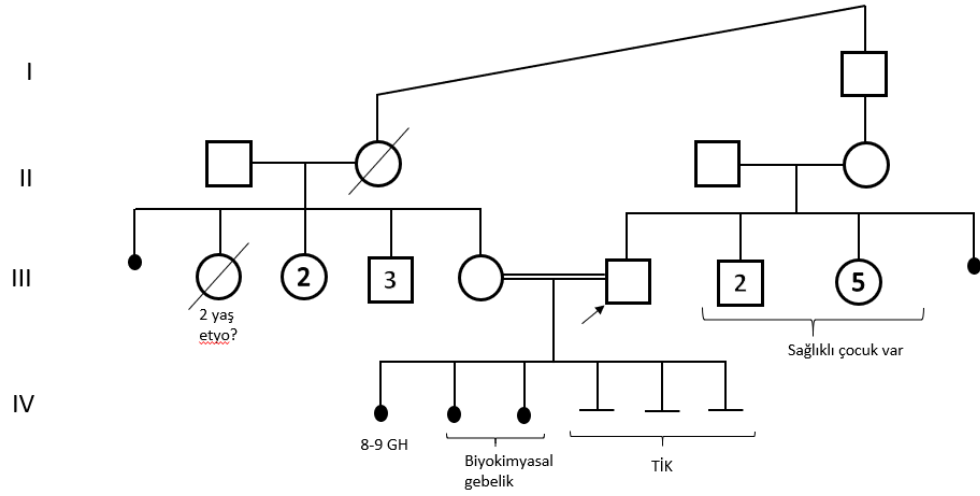
| Gen<br>(Transkript)         | Kalıtım<br>modeli | Varyant                                | dbSNP<br>Allel frekansı<br>(gnomAD) | Veritabanlarına göre<br>varyant sınıflaması     |
|-----------------------------|-------------------|----------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <i>FLG</i><br>(NM_002016.2) | OD, OR            | c.5170G>T<br>p.Gly1724*<br>heterozigot | rs747301529<br>0.000003976          | Patojenik (ACMG,<br>MutationTaster,<br>Clinvar) |

**Sonuç:** Olgu 4’de yapılan analiz sonucunda keratinizasyon anomalilerine sebep olan, İktiyozis vulgaris hastalığı ile ilişkili *FLG* geninde patojenik bir varyant heterozigot olarak bulundu. Olgunun eşinde daha önce yapılmış olan TED analizinde olgumuzda saptanan *FLG* genine ait herhangi bi varyantı taşımadığı belirlendi. Bu çalışmada eşinin *PKHD1*, *CELSR1*, *MMP26* ve *WNT6* genlerinde varyantlar saptanmış ancak olgumuzda bu varyantlar ya da bu genlerde herhangi bir varyant saptanmadı.

**Genetik yaklaşım ve danışma:** Saptanan varyant nedeniyle olgu klinik değerlendirilmesi ve takibi açısından Dermatoloji AD’na yönlendirildi.

#### 4.5. Olgu 5

Olguya ait aile ağacı (Şekil 11), klinik ve laboratuvar bulguları (Tablo 44), TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları (Sophia DDM) (Tablo 45) ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar (Tablo 46) aşağıda gösterildi.



Şekil 11.Olgu 5'e Ait Aile Ağacı

Tablo 44. Olgu 5'e Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları

|                                |                                           |
|--------------------------------|-------------------------------------------|
| Olgunun yaşı                   | 43                                        |
| Paternal yaş                   | 43                                        |
| Gebelik öyküsü                 | G3A3                                      |
| Akrabalık bilgisi              | Eşiyle 1,5.° kuzen                        |
| Ailede benzer öykü             | -                                         |
| Gebeliğin oluşma şekli         | Spontan, Başarısız YÜT (x3)               |
| Gebelik kaybı GH'sı            | A1: 8-9. GH, A2-3: biyokimyasal, TİK (x3) |
| Fetal/abortus karyotip analizi | -                                         |
| Geç fetal kayıp                | -                                         |
| Fetal USG bulgusu              | -                                         |
| Ek hastalık öyküsü             | -                                         |
| Varsa ilaç tedavisi            | -                                         |
| Ek klinik bulgu                | -                                         |
| Kromozom Analizi               | 46,XY                                     |
| Y MD Analizi                   | AZFa,b,c (+)<br>Delesyon (-)              |

**Tablo 45. Olgu 5'e Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları**

|                                          |        |
|------------------------------------------|--------|
| Toplam varyant sayısı                    | 29.684 |
| Zararsız/Olası zararsız varyant sayısı   | 25.315 |
| VUS varyant sayısı                       | 3.791  |
| Patojenik/Olası patojenik varyant sayısı | 578    |
| Homozigot varyant sayısı                 | 10.732 |
| Heterozigot varyant sayısı               | 18.952 |

**Tablo 46. Olgu 5'e Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar**

| Gen<br>(Transkript)          | Kalıtım<br>modeli | Varyant                                   | dbSNP<br>Allel frekansı<br>(gnomAD) | Veritabanlarına göre<br>varyant sınıflaması       |
|------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <i>APOB</i><br>(NM_000384.2) | OD, OR            | c.2170G>T<br>p.(Gly724Cys)<br>heterozigot | rs143425834<br>0.0001353            | VUS (ACMG)<br>patojenik (DANN,<br>MutationTaster) |

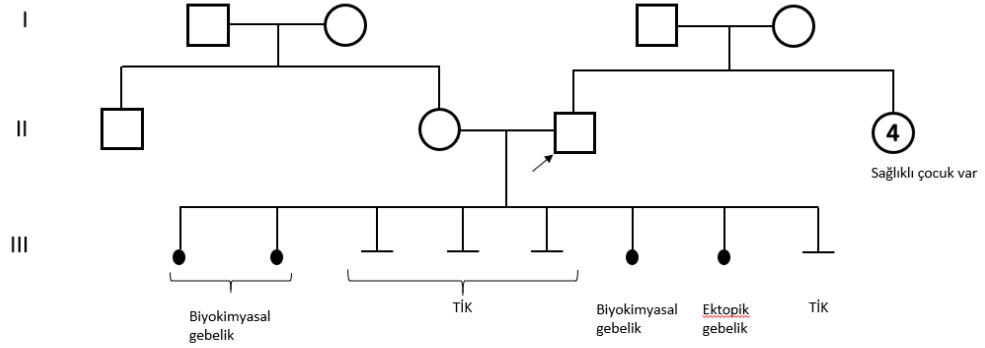
**Sonuç:** Olgu 5'te yapılan analiz sonucunda lipit metabolizmasında görevli *APOB* geninde saptanan varyant farklı veri tabanlarında VUS veya patojenik olarak değerlendirilmekteydi. Olgunun eşinde daha önce yapılmış olan TED analizinde olgumuzda saptanan *APOB* genine ait herhangi bir varyantı taşımadığı belirlendi. Bu çalışmada eşinin *CCNO*, *IGF2*, *PKD1L1*, *CTBP2*, *EXO1* ve *HLA-DRB5* genlerinde varyantlar saptanmış ancak olgumuzda bu varyantlar ya da bu genlerde herhangi bir varyant saptanmadı.

**Genetik yaklaşım ve danışma:** Olgu 5'te varyant saptanan *APOB* geninin infertilite ilişkili aday genler arasında yer alsa da erkek infertilitesine olası katılımının mekanizması henüz belirsiz olduğundan ileride yapılacak daha geniş çalışmalar ile *APOB* geni-infertilite ilişkisinin aydınlatılması sonrasında bu aileye verilecek genetik danışma yeniden şekillenecektir.

#### 4.6. Olgu 6

Olguya ait aile ağacı (Şekil 12), klinik ve laboratuvar bulguları (Tablo 47), TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları (Sophia DDM) (Tablo

48) ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar (Tablo 49) aşağıda gösterildi.



Şekil 12. Olgu 6'ya Ait Aile Ağacı

Tablo 47. Olgu 6'ya Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları

|                                |                                              |
|--------------------------------|----------------------------------------------|
| Olgunun yaşı                   | 32                                           |
| Maternal yaş                   | 38                                           |
| Gebelik öyküsü                 | G4A4                                         |
| Akrabalık                      | yok                                          |
| Ailede benzer öykü             | -                                            |
| Gebeliğin oluşma şekli         | Spontan, Başarısız YÜT (x4)                  |
| Gebelik kaybı GH'sı            | A1-A3: biyokimyasal, A4: ektopik<br>TİK (x4) |
| Fetal/abortus karyotip analizi | -                                            |
| Geç fetal kayıp                | -                                            |
| Fetal USG bulgusu              | -                                            |
| Ek hastalık öyküsü             | -                                            |
| Varsa ilaç tedavisi            | -                                            |
| Ek klinik bulgu                | Tek böbrek, oligospermi                      |
| Kromozom Analizi               | 46,XY                                        |
| Y MD Analizi                   | AZFa,b,c (+)<br>Delesyon (-)                 |

**Tablo 48. Olgu 6'ya Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları**

|                                          |        |
|------------------------------------------|--------|
| Toplam varyant sayısı                    | 30.078 |
| Zararsız/Olası zararsız varyant sayısı   | 25.504 |
| VUS varyant sayısı                       | 3.988  |
| Patojenik/Olası patojenik varyant sayısı | 586    |
| Homozigot varyant sayısı                 | 11.216 |
| Heterozigot varyant sayısı               | 18.862 |

**Tablo 49. Olgu 6'ya Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar**

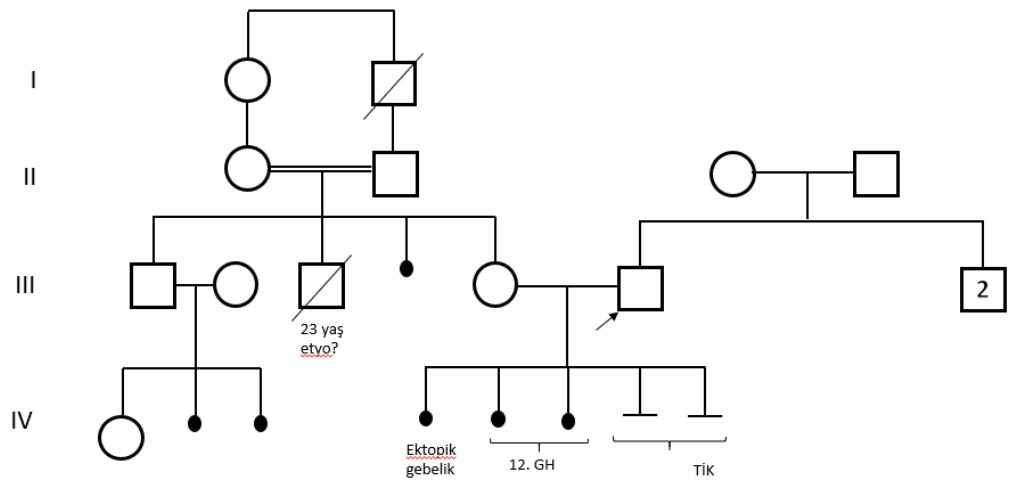
| Gen<br>(Transkript)            | Kalıtım<br>modeli | Varyant                                   | dbSNP<br>Allel frekansı<br>(gnomAD) | Veritabanlarına göre<br>varyant sınıflaması                  |
|--------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <i>CFTR</i><br>(NM_000492.3)   | OD, OR            | c.2991G>C<br>p.(Leu997Phe)<br>heterozigot | rs1800111<br>0.002294               | VUS (ACMG)<br>patojenik (DANN,<br>MutationTaster,<br>SIFT)   |
| <i>NPAS2</i><br>(NM_002518.3)  | ?                 | c.2453G>T<br>p.(Gly818Val)<br>heterozigot | rs764533479<br>0.000008160          | Likely benign<br>(ACMG)<br>patojenik (DANN,<br>SIFT)         |
| <i>MAGEA9</i><br>(NM_005365.4) | ?                 | c.483T>A<br>p.(Phe161Leu)<br>heterozigot  | rs1417233240<br>?                   | VUS (ACMG)<br>Benign<br>(MutationTaster)<br>patojenik (SIFT) |

**Sonuç:** Olgu 6'da yapılan analiz sonucunda farklı veritabanlarında vücut sirkadiyen ritminde görevli *NPAS2* geninde likely benign/patojenik, kanser-testis antijen grubu üyesi *MAGEA9* geninde VUS/patojenik, kistik fibroz etkeni *CFTR* geninde VUS/patojenik olarak sınıflandırılmış 3 varyantın fenotip ilişkili olabileceği düşünüldü. Olgunun eşinde daha önce yapılmış olan TED analizinde olgumuzda saptanan *CFTR*, *NPAS2* ve *MAGEA9* genlerine ait herhangi bi varyantı taşımadığı belirlendi. Bu çalışmada eşinin *CCNA2*, *MSH5*, *PAPLN* ve *ZSCAN4* genlerinde varyantlar saptanmış ancak olgumuzda bu varyantlar ya da bu genlerde herhangi bir varyant saptanmadı.

**Genetik yaklaşım ve danışma:** Olgu 6'da erkek infertilitesi ile ilişkili aday genlerden *NPAS2* ve *MAGEA9* saptanan varyantların öncelikle olgunun babasında ve annesinde (cinsiyet ile sınırlı etki nedeniyle) araştırılması planlandı. Olgunun eşinin *CFTR* geninde herhangi bir varyant için taşıyıcı olmadığı önceki çalışmadan bilinmekteydi. Ancak *CFTR* geni varyantı için olgunun kardeşleri ve onların sonuçlarına göre kardeşlerinin çocuklarında *CFTR* varyantının taranması ile yüksek riskli bireylerin/çiftlerin belirlenebileceği bilgisi aileye aktarıldı.

#### 4.7. Olgu 7

Olguya ait aile ağacı (Şekil 13), klinik ve laboratuvar bulguları (Tablo 50), TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları (Sophia DDM) (Tablo 51) ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar (Tablo 52) aşağıda gösterildi.



**Şekil 13. Olgu 7'ye Ait Aile Ağacı**

**Tablo 50. Olgu 7'ye Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları**

|                                |                                     |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| Olgunun yaşı                   | 34                                  |
| Paternal yaş                   | 41                                  |
| Gebelik öyküsü                 | G3A3                                |
| Akrabalık bilgisi              | -                                   |
| Ailede benzer öykü             | -                                   |
| Gebeliğin oluşma şekli         | Spontan, Başarısız YÜT (x2)         |
| Gebelik kaybı GH'sı            | A1/3: 12. GH, A2: 8-9. GH, TİK (x2) |
| Fetal/abortus karyotip analizi | -                                   |
| Geç fetal kayıp                | -                                   |
| Fetal USG bulgusu              | -                                   |
| Ek hastalık öyküsü             | -                                   |
| Varsa ilaç tedavisi            | -                                   |
| Ek klinik bulgu                | -                                   |
| Kromozom Analizi               | 46,XY                               |
| Y MD Analizi                   | AZFa,b,c (+)<br>Delesyon (-)        |

**Tablo 51. Olgu 7'ye Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları**

|                                          |        |
|------------------------------------------|--------|
| Toplam varyant sayısı                    | 30.253 |
| Zararsız/Olası zararsız varyant sayısı   | 25.875 |
| VUS varyant sayısı                       | 3.854  |
| Patojenik/Olası patojenik varyant sayısı | 524    |
| Homozigot varyant sayısı                 | 11.063 |
| Heterozigot varyant sayısı               | 19.190 |

**Tablo 52. Olgu 7'ye Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar**

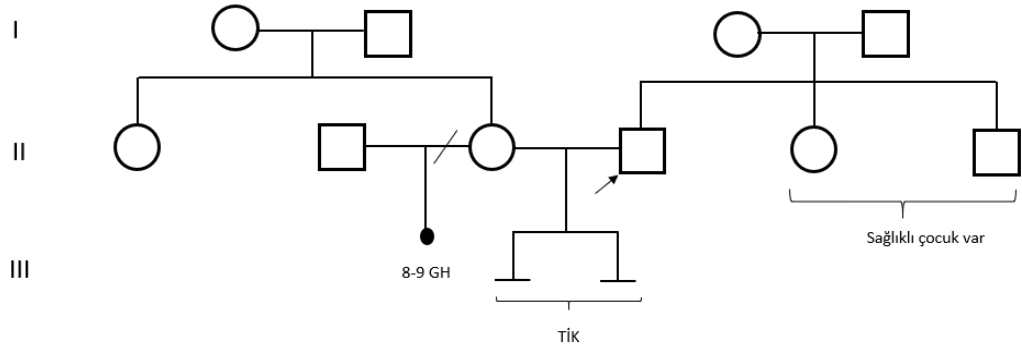
| Gen<br>(Transkript)           | Kalıtım<br>modeli | Varyant                                    | dbSNP<br>Allel frekansı<br>(gnomAD) | Veritabanlarına<br>göre varyant<br>sınıflaması                          |
|-------------------------------|-------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <i>CFTR</i><br>(NM_000492.3)  | OD, OR            | c.3154T>G<br>p.(Phe1052Val)<br>heterozigot | rs150212784<br>0.0006471            | Olası patojen<br>(ACMG)<br>Patojenik (DANN,<br>MutationTaster,<br>SIFT) |
| <i>DNAH6</i><br>(NM_001370.1) | ?                 | c.4672G>A<br>p.(Glu1558Lys)<br>heterozigot | rs130481868<br>8<br>0.00001295      | VUS (ACMG)<br>patojenik<br>(DANN, EIGEN,<br>MutationTaster,<br>SIFT)    |

**Sonuç:** Olgu 7'de yapılan analiz sonucunda, mikrotübül hareketlerini sağlayan sitoskeletal motor protein ilişkili dynein grubundan *DNAH6* geninde VUS, kistik fibroz etkeni *CFTR* geninde olası patojenik olarak sınıflandırılmış 2 varyant saptandı. Olgunun eşinde daha önce yapılmış olan TED analizinde olgumuzda saptanan *CFTR* ve *DNAH6* genlerine ait herhangi bi varyantı taşımadığı belirlendi. Bu çalışmada eşinin *CBS*, *NOP14* ve *SLC5A5* genlerinde varyantlar saptanmış ancak olgumuzda bu varyantlar ya da bu genlerde herhangi bir varyant saptanmadı.

**Genetik yaklaşım ve danışma:** Olgu 7'de infertilite ile ilişkili aday genler arasında yer alan *DNAH6* varyantının öncelikle olgunun kalıtım modeli henüz bilinmediğinden anne ve babasında araştırılması planlandı. Bu sonuca göre aile ağacının genişletilmesinin uygun olacağı düşünüldü. Olguda saptanan *CFTR* geni heterozigot varyantı açısından olgunun eşinin *CFTR* geni için taşıyıcı olmadığı önceki çalışmadan bilinmekteydi. Ancak olgunun kardeşlerinde *CFTR* gen varyantının araştırılmasının uygun olacağı aileye belirtildi.

#### 4.8. Olgu 8

Olguya ait aile ağacı (Şekil 14), klinik ve laboratuvar bulguları (Tablo 53), TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları (Sophia DDM) (Tablo 54) ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar (Tablo 55) aşağıda gösterildi.



Şekil 14. Olgu 8'e Ait Aile Ağacı

Tablo 53. Olgu 8'e Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları

|                                |                                      |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| Olgunun yaşı                   | 43                                   |
| Maternal yaş                   | 42                                   |
| Gebelik öyküsü                 | G1A1                                 |
| Akrabalık                      | yok                                  |
| Ailede benzer öykü             | -                                    |
| Gebeliğin oluşma şekli         | Spontan, Başarısız YÜT (x2)          |
| Gebelik kaybı GH'sı            | A1: 8-9. GH, TİK (x2)                |
| Fetal/abortus karyotip analizi | -                                    |
| Geç fetal kayıp                | -                                    |
| Fetal USG bulgusu              | -                                    |
| Ek hastalık öyküsü             | -                                    |
| Varsa ilaç tedavisi            | -                                    |
| Ek klinik bulgu                | Spermiyogram: az hareketli spermiler |
| Kromozom Analizi               | 46,XY                                |
| Y MD Analizi                   | AZFa,b,c (+)<br>Delesyon (-)         |

**Tablo 54. Olgu 8'e Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları**

|                                          |        |
|------------------------------------------|--------|
| Toplam varyant sayısı                    | 29.834 |
| Zararsız/Olası zararsız varyant sayısı   | 25.433 |
| VUS varyant sayısı                       | 3.848  |
| Patojenik/Olası patojenik varyant sayısı | 553    |
| Homozigot varyant sayısı                 | 10.466 |
| Heterozigot varyant sayısı               | 19.368 |

**Tablo 55. Olgu 8'e Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar**

| Gen<br>(Transkript)              | Kalıtım<br>modeli | Varyant                                  | dbSNP<br>Allel frekansı<br>(gnomAD) | Veritabanlarına göre<br>varyant sınıflaması                                    |
|----------------------------------|-------------------|------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <i>KLK14</i><br>(NM_001311182.1) | ?                 | c.656A>G<br>p.(Asp219Gly)<br>heterozigot | rs201296079<br>0.004635             | Likely benign<br>(ACMG)<br>patojenik<br>(MutationTaster,<br>SIFT, DANN, EIGEN) |
| <i>CFTR</i><br>(NM_000492.3)     | OD, OR            | c.91C>T<br>p.(Arg31Cys)<br>heterozigot   | rs1800073<br>0.001678               | VUS (ACMG)<br>Patojenik (DANN,<br>MutationTaster)                              |

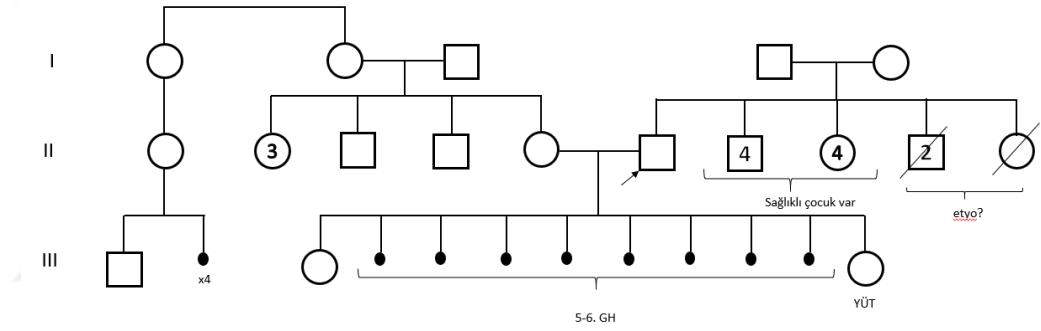
**Sonuç:** Olgu 8'de, yapılan analizde biri koagülasyon-likefaksiyon (pıhtılaşma-sıvılaşma) kademesinde görevli serin proteazlar ailesinden *KLK14* geninde farklı veritabanlarında likely benign/patojenik, diğeri kistik fibroz etkeni *CFTR* geninde VUS/patojenik olarak sınıflandırılmış 2 varyant saptandı. Olgunun eşinde daha önce yapılmış olan TED analizinde olgumuzda saptanan *KLK14* ve *CFTR* genlerine ait herhangi bi varyantı taşımadığı belirlendi. Bu çalışmada eşinin *CEP290*, *DUOX2* ve *FBN3* genlerinde varyantlar saptanmış ancak olgumuzda bu varyantlar ya da bu genlerde herhangi bir varyant saptanmadı.

**Genetik yaklaşım ve danışma:** Olgu 8'de saptanan ve infertilite ile ilişkili aday genler arasında yer alan *KLK14* varyantının kalıtım modeli tanımlanmamış olduğundan öncelikle olgunun anne ve babasında araştırılması ve bu sonuçlara göre aile ağacının genişletilmesi planlandı. Olgunun eşinin *CFTR* geninde herhangi bir varyant

bulunmadığı önceki çalışmadan bilinmekteydi. Ancak olgunun kardeşlerinde bu varyantın araştırılması ve riskli çiftlerin belirlenmesi bilgisi aile ile paylaşıldı.

#### 4.9. Olgu 9

Olguya ait aile ağacı (Şekil 15), klinik ve laboratuvar bulguları (Tablo 56), TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları (Sophia DDM) (Tablo 57) ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar (Tablo 58) aşağıda gösterildi.



Şekil 15. Olgu 9'a Ait Aile Ağacı

**Tablo 56. Olgu 9'a Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları**

|                                |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|
| Olgunun yaşı                   | 45                              |
| Maternal yaş                   | 45                              |
| Gebelik öyküsü                 | G10P2A8                         |
| Akrabalık                      | yok                             |
| Ailede benzer öykü             | -                               |
| Gebeliğin oluşma şekli         | Spontan, Başarılı YÜT (G10, x1) |
| Gebelik kaybı GH'sı            | A1-A8: 5-6. GH                  |
| Fetal/abortus karyotip analizi | -                               |
| Geç fetal kayıp                | -                               |
| Fetal USG bulgusu              | -                               |
| Ek hastalık öyküsü             | -                               |
| Varsa ilaç tedavisi            | -                               |
| Ek klinik bulgu                | -                               |
| Kromozom Analizi               | 46,XY                           |
| Y MD Analizi                   | AZFa,b,c (+)<br>Delesyon (-)    |

**Tablo 57. Olgu 9'a Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Sophia DDM Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları**

|                                          |        |
|------------------------------------------|--------|
| Toplam varyant sayısı                    | 29.640 |
| Zararsız/Olası zararsız varyant sayısı   | 25.297 |
| VUS varyant sayısı                       | 3.813  |
| Patojenik/Olası patojenik varyant sayısı | 530    |
| Homozigot varyant sayısı                 | 10.908 |
| Heterozigot varyant sayısı               | 18.732 |

**Tablo 58. Olgu 9'a Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olabileceği düşünülen varyantlar**

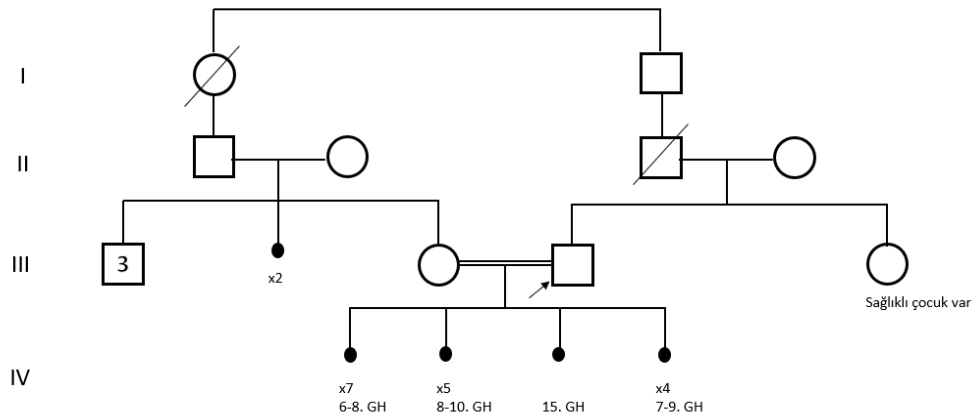
| Gen<br>(Transkript)               | Kalıtım<br>modeli | Varyant                                   | dbSNP<br>Allel frekansı<br>(gnomAD) | Veritabanlarına göre<br>varyant sınıflaması              |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <i>RSPH4A</i><br>(NM_001010892.2) | ?                 | c.1105G>C<br>p.(Ala369Pro)<br>heterozigot | cm1515268                           | VUS (ACMG)<br>patojenik<br>(Polyphen,<br>MutationTaster) |

**Sonuç:** Olgu 9’da yapılan analiz sonucunda primer silier diskenezi ilişkili *RSPH4A* geninde farklı veritabanlarında VUS ya da patojenik olarak değerlendirilen bir varyant saptandı. Olgunun eşinde yapılan TED analizinde incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek bir varyant saptanmamıştı.

**Genetik yaklaşım ve danışma:** Olgu 9’de saptanan primer silier diskenezi ilişkili *RSPH4A* genindeki heterozigot varyant için aile ağacının genişletilmesi, infertilite ve gebelik kayıpları açısından tekrar sorgulanması planlandı.

#### 4.10. Olgu 10

Olguya ait aile ağacı (Şekil 16), klinik ve laboratuvar bulguları (Tablo 59), TED verisinin biyoinformatik analizi ile elde edilen varyant sayıları (egenemaster) (Tablo 60) ve çalışmada incelenen fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde saptanan varyantlar (Tablo 61) aşağıda gösterildi.



**Şekil 16. Olgu 10’a Ait Aile Ağacı**

**Tablo 59. Olgu 10'a Ait Klinik ve Laboratuvar Bulguları**

|                                |                                                  |
|--------------------------------|--------------------------------------------------|
| Olgunun yaşı                   | 39                                               |
| Maternal yaş                   | 40                                               |
| Gebelik öyküsü                 | G17A17                                           |
| Akrabalık                      | Eşiyle 2.° kuzen                                 |
| Ailede benzer öykü             | -                                                |
| Gebeliğin oluşma şekli         | Spontan, Başarısız YÜT (x2)                      |
| Gebelik kaybı GH'sı            | A1-12: 6-10. GH, A13: 15. GH,<br>A14-17: 7-9. GH |
| Fetal/abortus karyotip analizi | A12: 46,XX, A13:46,XX,<br>A14: 46,XX             |
| Geç fetal kayıp                | -                                                |
| Fetal USG bulgusu              | -                                                |
| Ek hastalık öyküsü             | -                                                |
| Varsa ilaç tedavisi            | -                                                |
| Ek klinik bulgu                | -                                                |

**Tablo 60. Olgu 10'a Ait TED Verisinin Biyoinformatik Analiz ile Egenemaster Veritabanının Oluşturduğu Varyant Sayıları**

|                                          |        |
|------------------------------------------|--------|
| Toplam varyant sayısı                    | 29.776 |
| Zararsız/Olası zararsız varyant sayısı   | 24.106 |
| VUS varyant sayısı                       | 5.269  |
| Patojenik/Olası patojenik varyant sayısı | 401    |
| Homozigot varyant sayısı                 | 10.884 |
| Heterozigot varyant sayısı               | 18.892 |

**Tablo 61. Olgu 10'a Ait TED verisinin biyoinformatik analizi sonucunda klinik ilişkili olduğu düşünülen varyantlar**

| Gen<br>(Transkript)          | Kalıtım<br>modeli | Varyant                                 | dbSNP<br>Allel frekansı<br>(gnomAD) | Veritabanlarına göre<br>varyant sınıflaması                                    |
|------------------------------|-------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <i>FAT1</i><br>(NM_005245.4) | ?                 | c.2563G>A<br>p.Gly855Arg<br>heterozigot | rs180820128<br>0.002119             | Likely benign<br>(ACMG)<br>Patojenik (DANN,<br>EIGEN,<br>MutationTaster, SIFT) |

**Sonuç:** Olgu 10’da yapılan analiz sonucunda lipit ve mitokondriyal enerji metabolizmasında etkin olan *FAT1* geninde farklı veritabanlarında olası zararsız veya patojenik olarak değerlendirilen bir varyant saptandı. Olgunun eşinde daha önce yapılmış olan TED analizinde olgumuzda saptanan *FAT1* genine ait herhangi bi varyantı taşımadığı belirlendi. Bu çalışmada eşinin *CEP290*, *SLAIN1*, *CCDC141*, *HSF1*, *LRIF1* ve *MMP10* genlerinde varyantlar saptanmış ancak olgumuzda bu varyantlar ya da bu genlerde herhangi bir varyant saptanmadı.

**Genetik Yaklaşım ve Danışma:** Olgu 10’da saptanan lipit ve mitokondriyal enerji metabolizmasında görevli *FAT1* geninin infertilite ve TGK ile ilişkili klinik etkinliği net olmadığından (teorik olarak ilişkisi muhtemel olsa da) daha geniş çalışma sonuçlarının *FAT1* geni etkisi açısından değerlendirilmesi gerektiği ve bu aşamada ailede ileri çalışma yapılmamasının uygun olacağı düşünüldü.

**Tablo 62.Serimizde saptanan klinik ilişkili olduğu düşünülen veya bilinen bir hastalık için tanımlanmış patojenik varyantların genlere göre dökümü**

| Gen           | Varyant                     | Zigosite    | Transkript No | dbSNP        | GnomAD Allel Frekansı | ACMG'ye göre Varyant Sınıflandırması | Sonuç         | Olgu   |
|---------------|-----------------------------|-------------|---------------|--------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------|--------|
| <b>DMD</b>    | c.5236G>A                   | Hemizigot   | NM_000109.3   | rs1359089046 | 0.000005455           | Patojenik                            | BMD           | Olgu 3 |
| <b>CFTR</b>   | c.2657+5G>A                 | Heterozigot | NM_000492.2   | N/A          | 0.00007555            | Patojenik                            | CFTR taşıyıcı | Olgu 3 |
|               | c.29911G>C<br>p.(Leu997Phe) | Heterozigot | NM_000492.3   | rs1800111    | 0.002294              | VUS                                  | CFTR taşıyıcı | Olgu 6 |
|               | c.3154T>G<br>p.(Phe1052Val) | Heterozigot | NM_000492.3   | rs150212784  | 0.0006471             | Olası Patojenik                      | CFTR taşıyıcı | Olgu 7 |
|               | c.91C>T<br>p.(Arg31Cys)     | Heterozigot | NM_000492.3   | rs1800073    | 0.001678              | VUS                                  | CFTR taşıyıcı | Olgu 8 |
| <b>NPAS2</b>  | c.2453G>T<br>p.(Gly818Val)  | Heterozigot | NM_002518.3   | rs764533479  | 0.000008160           | Likely benign                        | Aday gen      | Olgu 6 |
| <b>MAGEA9</b> | c.483T>A<br>p.(Phe161Leu)   | Heterozigot | NM_005365.4   | rs1417233240 | N/A                   | VUS                                  | Aday gen      | Olgu 6 |
| <b>TSSK2</b>  | c.637T>C<br>p.(S213P)       | Heterozigot | NM_053006.4   | rs150218881  | 0.0007957             | Olası patojenik                      | Aday gen      | Olgu 1 |
| <b>TTC21B</b> | c.1546C>T<br>p.(Q516X)      | Heterozigot | NM_024753.4   | rs779134983  | 0,00002389            | Patojenik                            | Siliyopati    | Olgu 1 |
| <b>APOB</b>   | c.2170G>T<br>p.(Gly724Cys)  | Heterozigot | NM_000384.2   | rs143425834  | 0.0001353             | VUS                                  | Aday gen      | Olgu 5 |

|               |                             |             |                |              |             |               |                      |         |
|---------------|-----------------------------|-------------|----------------|--------------|-------------|---------------|----------------------|---------|
| <b>RSPH4A</b> | c.1105G>C<br>p.(Ala369Pro)  | Heterozigot | NM_001010892.2 | cm1515268    | -           | VUS           | Aday gen             | Olgu 9  |
| <b>HGD</b>    | c.175delA                   | Heterozigot | NM_000187.3    | rs397515517  | 0.0001194   | Patojenik     | Alkaptonüri taşıyıcı | Olgu 2  |
| <b>CD36</b>   | c.949dupA                   | Heterozigot | NM_000072.3    | rs70961716   | 0.0001077   | Patojenik     | İmmünite ilişkili    | Olgu 2  |
| <b>KLK14</b>  | c.656A>G<br>p.(Asp219Gly)   | Heterozigot | NM_001311182.1 | rs201296079  | 0.004635    | Likely benign | Aday gen             | Olgu 8  |
| <b>DNAH6</b>  | c.4672G>A<br>p.(Glu1558Lys) | Heterozigot | NM_001370.1    | rs1304818688 | 0.00001295  | VUS           | Aday gen             | Olgu 7  |
| <b>FAT1</b>   | c.2563G>A<br>p.(Gly855Arg)  | Heterozigot | NM_005245.4    | rs180820128  | 0.002119    | Likely benign | Aday gen             | Olgu 10 |
| <b>FLG</b>    | c.5170G>T<br>p.(Gly1724*)   | Heterozigot | NM_002016.2    | rs747301529  | 0.000003976 | Patojenik     | İktiyozis vulgaris   | Olgu 4  |

## 5. TARTIŞMA

Primer ve sekonder olmak üzere 2 grupta değerlendirilen infertilite her 5 çiftten 1'inde gözlenen, tüm toplumları ilgilendiren ciddi bir tıbbi sorundur. Hem kadın hem de erkek kökenli olabilen genetik ve nongenetik faktörlerden kaynaklanan, etiyolojik faktörlerin örtüşmesi nedeniyle ayırıcı tanının güçleştiği klinik bir sorun olsa da aynı zamanda psikolojik, sosyolojik ve ekonomik etkileri nedeniyle aile ve toplum için önemli bir sorun oluşturmaktadır.

Fertilite için erkeğin normal spermatogenez, başarılı epididimal maturasyon ve sperm depolanması, uygun zamanlı cinsel ilişki koşullarını birlikte karşılaması gerekmektedir. Bu aşamalardan herhangi birindeki kusur kendini infertilite olarak göstermektedir. Son çalışmalar infertilitenin çiftlerin yaklaşık %15'ini etkilediğini ve bunların da yaklaşık yarısının erkek kaynaklı olduğunu göstermektedir (101). Dünya Sağlık Örgütü verileri ise infertil çiftlerin yaklaşık %20'sinin erkek kaynaklı olduğunu ve genetik faktörlerin olguların %15-30'undan sorumlu olduğu bildirilmektedir (100,102). En sıklıkla görülenler genetik sebepler cinsiyet kromozom anomalileri ve Y kromozomu mikrodelsiyonlarıdır (103,104). Ayrıca otozomal kromozomal aberasyonlar ile kistik fibrozis gibi tek gen hastalıkları da önemli bir yer tutmakta ancak erkek infertilitesinin önemli bir kısmında (yaklaşık %40) etiyoloji aydınlatılamamaktadır (105,148,149,150).

Kadın ve erkek infertilitesi ile ilişkili yüzlerce tek gen ya da oligogenik etkilerin varlığı tahmin edilmekle birlikte geçmiş dönemlerde Sanger dizileme tekniğinin kısıtlılıkları nedeniyle bilinen bir kaç gen dışında diğer genlerin araştırılması mümkün olamamaktaydı. Son 10 yılda kullanıma giren ve etkinliği ispatlanan tüm genomun dahi dizilemesine olanak sağlayan YND yöntemi mendelyen hastalıklarla ilişkili tanımlanmamış genlerin aydınlatılmasında devrimsel bir aşama sağlamıştır. Bu teknoloji ile fenotipi belli ancak geni bilinmeyen ya da henüz tanımlanmamış fenotipler ile ilişkili gen/lerin tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Literatürde daha çok fenotipi etkileyen genetik kökenli hastalıklarla ilgili çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte tekrarlayan fetal kayıp ya da infertilitenin genetik etiyolojisini aydınlatmaya yönelik YND tekniğinin kullanıldığı az sayıda panel ya da TED analiz sonuçlarını gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Oysa bu sorun toplumların önemli bir bölümünü etkilemekte, tıbbi ve sosyoekonomik ciddi sorunlara yol açmaktadır. Diğer hastalıklarda

ilişkili genin tanımlanması tanı, prenatal/preimplantasyon tanı imkanları sağlamasının yanı sıra etkin ilaçların geliştirilmesine ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır. İnfertilite ilişkili genlerin tanımlanması da bu ailelerin sağlıklı çocuk sahibi olma imkanı sunabileceği gibi tedavi seçeneklerini de etkileme potansiyeline sahiptir.

Tıbbi Genetik AD'mızda daha önce infertilite tanısı alan çiftler 34 kadın olguda TED analizi yapılmıştı. Bu olgulardan fetus için risk oluşturabilecek genlerde variant saptanan kadınlardan 10'unun eşi bu çalışma kapsamında TED analizi ile incelendi.

### 5.1. Moleküler Analiz Sonuçlarının Yorumlanması

Bu çalışma, sebebi açıklanamayan TGK ve infertilite olgularında TED yöntemi ile paternal genetik faktörlerin araştırıldığı Türkiye'den ilk seri çalışmasıdır. Çalışma kapsamında, 10 erkek olguya ait TED verilerinin biyoinformatik analizlerinde saptanan varyantlar ayrıntılı olarak irdelendi ve 8 olguda fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde 14 varyant tespit edildi. İki olguda infertilite ile ilişkilendirilmiş aday genlerde herhangi bir varyant saptanmadı. Bu iki olgunun birinde immun fonksiyonda görevli bir gende ve metabolik yollarda etkili bir gende olmak üzere birer varyant; diğerinde ise keratinizasyonla ilişkili bir gende varyant saptandı.

Bir olguda *TCC21B* geninde saptanan patojenik bir varyant ile (Olgu 1) (%10) etiyoloji aydınlatıldı. Dört olguda *CFTR* geni ilişkili (%40), patojenik olarak tanımlanmış veya veritabanlarında patojenitesi henüz tam olarak aydınlatılamamış taşıyıcılık saptandı. Yedi olguda infertilite ve TGK kliniği ile ilişkisi net olarak açıklanamamış ancak aday genler arasında yer alan varyantlar saptandı (%70).

Serimizde 2 olguda direkt infertilite ile ilişkili olmayan 2 gende patojenik varyant saptandı (%20). Bu hasatlıklardan biri dermatolojik (iktiyozis vulgaris) (Olgu 4), diğeri ise BMD ile ilişkili idi (Olgu 3). TED analizlerinde araştırmanın asıl nedeni ile ilişkili olmayan, tesadüfi olarak diğer genlerde saptanan mutasyonların aile ile paylaşılıp paylaşılmaması konusu bilimsel ve etik açıdan tartışılmaktadır. Bu nedenle tanı amacı ile yapılacak TED analizleri öncesinde genetik danışmada bu olasılıktan söz edilmesi ve hastanın isteği yönünde özellikle yaşamın geç döneminde ortaya

çıkabilecek hastalıkların tanısının bildirilmesi için onam alınabileceği görüşü ağırlık kazanmıştır (163).

Serimizde patojenik, olası patojenik veya veritabanları net olmayan VUS varyantlar saptanan genler ile ilişkili genel bilgiler aşağıda özetlenmiştir.

### ***DMD Geni***

*DMD* geni, iskelet kaslarındaki membran iskelet proteinini kodlar. *DMD* geni patolojik varyantları, kas dokusunun ilerleyici zayıflaması olarak tanımlanan Duchenne (OMİM #310200) ve Becker (OMİM #300376) tipi musküler distrofisinde ve dilate kardiyomyopati (OMİM #302045) bildirilmektedir. Duchenne musküler kas distrofisi (DMD) genellikle erken çocukluk döneminde oturmada ve yürümede gecikmeler dahil olmak üzere ilerleyici motor gerilik ile ortaya çıkar. Proksimal kas zayıflığı temel patolojidir; yürüme, merdiven çıkma, koşma, zıplama ve çömelme pozisyonundan ayağa kalkma zorluğu ile dikkat çeker. DMD hızlı ilerlemekte ve etkilenen çocuklar 12 yaşına kadar tekerlekli sandalyeye bağımlı hale gelebilmektedir. Kardiyomiyopati, hemen hemen tüm DMD'li bireylerde 18 yaşından sonra ortaya çıkar. Solunum komplikasyonları ve ilerleyici kardiyomiyopati yaygın ölüm nedenleri olmakla birlikte, ortalama ömür ikinci üçüncü dekat olarak bildirilmektedir. Becker kas distrofisi (BMD), DMD'nin hafif formu olup DMD'ye göre daha ileri yaşlarda ortaya çıkan iskelet kası zayıflığı ile karakterizedir. Klinik spektrumun hafif ucunda 30 yaşından sonra kas zayıflığı semptomlarının başlayabildiği ve 60 yaşlarına kadar yürüme fonksiyonlarının belirgin etkilenmediği olgular bildirilmiştir. Daha hafif iskelet kası tutulumuna rağmen, dilate kardiyomyopati kaynaklı kalp yetmezliği morbiditenin yaygın bir nedenidir. *DMD* geni ile ilişkili izole dilate kardiyomyopati, sol ventrikül genişlemesi ve konjestif kalp yetmezliği ile karakterizedir (151). Musküler distrofilere metabolik ve endokrin değişiklikler (glikoz metabolizması, insülin direnci vb.) gözlenmektedir. Hipogonadizm, düşük testosteron seviyeleri ve büyüme hormonu gibi endokrin problemler bildirilmiştir. Bildirilen endokrin patolojilerin erkek üremesini etkileyebileceği düşünülmektedir (152, 153). Ancak yapılan hayvan deneylerinde semen kalitesi ve üreme fonksiyonlarında belirgin fark gözlenmemiştir (154).

### ***CFTR Geni***

*CFTR* (transmembran iletkenlik düzenleyici gen) geni, cAMP ilişkili epiteliyal klor iyonu transportunu düzenleyen bir protein kodlar ve biallelik patojenik varyantları Kistik fibroz (KF, OMİM #219700) hastalığına yol açar. Kistik fibroz otozomal resesif ciddi bir hastalıktır. Beyaz ırkta, 7. kromozom üzerinde yer alan *CFTR* geninde mutasyon taşıyıcılık oranı yaklaşık %4 ile batı toplumlarında en sık görülen genetik hastalıktır. KF, solunum yolu epiteli, ekzokrin pankreas, bağırsak, hepatobiliyer sistem ve ekzokrin ter bezlerini etkileyen multisistemik bir hastalıktır. Morbiditeler, bronşektaziye ek progresif obstrüktif akciğer hastalığı, hospitalizasyon gerektirebilen sık alt solunum yolu enfeksiyonları, pankreas yetersizliği, malnütrisyon ve infertiliteyi içerir. CBAVD, *CFTR* gen mutasyonları ile ilişkilidir ve Birleşik Krallık'ta yapılan çalışmada kliniğe başvuran obstrüktif azospermi hastalarının ~%2'sinde saptanmıştır (164). *CFTR* veri tabanında yaklaşık 1.500 mutasyon listelenmiştir. CBAVD'lı erkeklerle ilgili çokça çalışma yapılmıştır; bu çalışmalarda en sık saptanan mutasyonlar  $\Delta F508$ , R117H ve W1282X'dir. Ancak mutasyonların sıklığı ve çeşitliliği hastanın etnik kökenine bağlı değişebilmektedir (165,166). *CFTR*'nin kodlamayan bölgesindeki bir varyantının (5T alleli) önceden polimorfizm olarak değerlendirilirken artık bir polimorfizmden ziyade hafif bir *CFTR* mutasyonu olarak kabul edilir ve her CBAVD hastasında araştırılması önerilmektedir (166). CBAVD'lı erkekler genellikle hafif klinik KF bulgularına sahiptir (sık alt solunum yolu enfeksiyonu öyküsü gibi) KF resesif kalıtmalı bir hastalık olduğundan, hastalık oluşumu için *CFTR* geninin her iki allelinde de mutasyon bulunmalıdır. KF'li erkeklerin %95'inden fazlasında CBAVD bulgusuna bağlı olarak sterilite gözlenir. *CFTR* geni için heterozigot mutasyon taşıyıcılarının genellikle asemptomatik olması beklenmesine rağmen, bazı klinik çalışmalar, CBAVD olmayan azospermi olgularında *CFTR* geni heterozigot mutasyonlarının fertil erkekler veya genel popülasyona oranla daha yüksek olduğunu göstermiş (%3.8) ve heterozigot mutasyonların CBAVD dışındaki erkek sterilite riskini artırabileceği ileri sürülmüştür (155). Ancak genel görüş heterozigot taşıyıcıların asemptomatik olduğu yönündedir (156).

*CFTR*, 5T/TG analizi. *CFTR*'nin intron 8'inde bulunan bir timidin baz dizisi olan bir poli T bölgesi, dizinin boyutuna bağlı olarak *CFTR* ile ilgili bozukluklarla ilişkilendirilebilir. Poly T bölgesinin üç yaygın boyutsal varyantı 5T, 7T ve 9T'dir. Hem

7T hem de 9T, polimorfik varyantlar olarak ancak 5T değişken penetrans gösteren bir varyant olarak kabul edilir. 5T varyantının, intron 8 *splicing* işlemine negatif etki ettiği düşünölmektedir. Varyant patojenitesi sınıflaması hafif olan p.Arg117His varyantı cis pozisyonunda 5T varyantı ile birlikte olduğunda daha baskın fenotipe sebep olabilmektedir. Özellikle Poly T bölgesinin, CFTR geninde p.Arg117His (NM\_000492.3) varyantı tespit edildiğinde veya yetişkin bir erkek CBAVD için değerlendirilirken ek test olarak değerlendirilmesi uygundur (155).

### **NPAS2 Geni**

Nöronal PAS bölgesi protein 2 (NPAS2) proteini, insanlarda *NPAS2* geni tarafından kodlanan ve transkripsiyon faktörlerinin temel heliks sarmal heliks (bHLH) ailesinin bir üyesidir. NPAS2 proteini beyinde (özellikle hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeğinde), testiste ve prostatta eksprese edilmektedir. Vücut sirkadiyen ritmi hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeğinde bulunan ana saatten oluşur. Sirkadiyen saat organizmaların biyokimyalarının, fizyolojilerinin ve davranışlarının günlük ritmlerini kontrol eder (108). *NPAS2* geni, testis tübüllerindeki germ hücrelerinde ve interstisyel boşluktaki Leydig hücrelerinde eksprese edilmektedir. NPAS2 proteininin vücut sirkadiyen ritminde ve doğurganlıkta rol aldığı düşünölmektedir (109). İn vitro ve in vivo çalışmalar, NPAS2'nin circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like1 (BMAL1) de dahil olmak üzere bir dizi proteinle etkileşimde olduğunu göstermektedir (110). *CLOCK/NPAS2'nin* vücut sirkadyen ritminde birlikte görev aldıkları fare çalışmalarında gösterilmiştir (111). Bu iki gen *BMAL1* geni ile birlikte transkripsiyonel düzenleyici olarak işlev görür (112). *BMAL1* geni *knockout* farelerde, steroidogenezin hız sınırlayıcı basamağı olan "steroidogenic acute regulatory protein" (StAR) geni ve protein ekspresyonunun testislerde azaldığı gösterilmiş, erkek farelerde infertilite gözlenmiştir ve bu durumun sebebi olarak steroidogenezde bozulma olduğu ileri sürölmüştür (113). *NPAS2-BMAL1* etkileşiminin Leydig hücrelerinde StAR ekspresyonunun düzenlenmesinde görev aldığı düşünöldüğünde mutant *NPAS2'nin* Leydig hücrelerindeki StAR ekspresyonunu etkilemesini ve infertiliteye sebep olabileceğı öne sürölmüştür. CLOCK ve NPAS2 gibi diğer sirkadyem ritm proteinlerinin in vivo ve in vitro modellerde spermatogenez, testosteron ve infertilite üzerindeki araştırmalar henüz devam etmekte ve ilişkili genler infertilite için aday genler arasında yer almaktadır (114).

### ***MAGEA9 Geni***

MAGE gen ailesi, kanser-testis antijen grubu üyesidir. Tümör hücrelerinde eksprese edilmesinin yanı sıra normal dokulardan sadece testislerde eksprese edilmektedir. Kanser immünoterapisi için hedefleri temsil eden tümöre özgü antijenleri kodlarlar (115). Testiste eksprese olan *MAGEA9* amplikonik bölgesi, X kromozomu üzerindeki genlerin ve kopya sayısı varyantlarının araştırılması çalışmasında Xq28'de lokalize olduğu belirlenmiştir. Xq28 deki delesyonların oligo/azoospermik erkeklerde %1.1 oranla tanımlanmış ve infertilite ilişkili olduğu düşünülmüştür (116, 117). Portekiz popülasyonunda oligo/azospermik erkeklerde yapılan çalışmada yaklaşık %2 oranında Xq28 delesyonu saptanmış ve bunun erkek germ hücrelerinde spermatogenez regülasyonunda yer alan *MAGEA9* geni kaybı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (118). X kromozom CNV çalışmaları ile *MAGEA9* geninin spermatojenik yetmezlikle ilişkili etkisinin olduğu ve erkek sterilitesinin etiyolojik araştırmasında aday genler arasında araştırılması gerektiği düşünülmektedir (119).

### ***TSSK2 Geni***

“Testis-specific serine/threonine kinase” (TSSK) ailesinin bir üyesi olan *TSSK2*, ağırlıklı olarak testiste eksprese edilir. Erkek farelerde gen hedefleme tekniği ile *knockout* edilen *TSSK2* geninin infertiliteye neden olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç, insan homolog *TSSK2* genindeki mutasyonların da, insan spermatogenezinde sorunlara yol açabileceği fikrini akla getirmiştir. *TSSK2* genindeki mutasyonlar ile insanlarda idiyopatik infertilite arasındaki olası ilişkiyi araştırmak için, azospermi veya şiddetli oligozoospermi olan hastalarda yapılan çalışmalarda *TSSK2* geninin insanlarda erkek idiyopatik infertilite ile ilişkili olabileceğini sonucuna varılmış olup *TSSK2* geni erkek infertilitesi için aday genler arasında yer almaktadır (120,121).

### ***TTC21B Geni***

*TTC21B* geni, retrograd intraflagellar taşıma için gerekli olan ve siliyer fonksiyona dahil olan bir aksonemal proteini kodlar. Patojenik varyantları nefronofitizis tip-12 (Joubert sendromu tip-11; OD/OR kalıtmı; MIM #613820) ve asfiks edici torasik displazi tip-4 (OR; MIM #613819) ile ilişkilendirilmiştir (157). Flagellar transport-A kompleksinde IFT139 (THM1) proteinini kodlar ve susturulduğu fare

çalışmalarında, embriyoların ekstremite, göz ve beyin gelişiminde anomalilerin olduğu görülmüştür (158, 159).

### ***APOB Geni***

Apolipoprotein B, şilomikronlar ve düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL'ler) üzerindeki ana apolipoproteindir. *APOB*, düşük yoğunluklu lipoprotein partiküllerinin dolaşımından reseptör aracılı uzaklaştırılması için ligand görevi görür (122). *APOB*'nin hedeflenmiş bir mutasyonu için heterozigot durumda olan erkek farelerin, nöral tüp defektleri ve düşük HDL ester oranlarına ek olarak erkek infertilitesi gösterdiği; homozigot durumda ise embriyonik letalite sergilediğini bildirmiştir. Bu farelerden alınan spermilerin, yumurtaları hem in vitro hem de in vivo döllemede başarısız olduğu görüldü. İnsan *APOB*'sini kodlayan genomik sekans, genetik olarak tasarlanmış hayvanlara dahil edildiğinde, normal doğurganlık yetisinin tekrar kazanıldığı gösterilmiştir (123,124). Bu deneyler *APOB*'nin farelerde erkek sterilite fenotipine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu bulgular, *APOB* geninin insanda erkek fertilitesinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmekte (123,124) ve erkek fertilitesinde lipid metabolizmasının önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Lipitler, erkek gamet membranının ve sıvı içeriğinin önemli bileşenleridir. Sperm aktivasyonu, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu sırasında lipid membranında ve sıvı içeriklerinde bileşenler spermin yumurtayı döllemesi için önem arz etmektedir (125, 126).

### ***RSPH4A Geni***

Radyal uzanımlar merkezi mikrotübül çifti ile dynein kolları arasında sinyal iletim iskelesi oluşturan çok alt birimli “sap” ve “baş” kısımları olan yapılardır. Radyal uzantılar, silia, sperm ve flagella aksonemleri gibi yapılar boyunca düzenli aralıklarla yerleşmiştir. *RSPH4A*'nın silialardaki radyal uzantıların “baş” kısmının bir bileşeni olduğu tahmin edilmektedir (127). *RSPH4A* geni patojenik varyantları kalıtımı OMIM'de kalıtımı bilinmeyen primer siliyer diskinezi tip-11 (MIM # 612649) ile ilişkilendirilmiştir. Birincil siliyer diskinezi (PSD-11; MIM 612649), bozulmuş siliyer hareketliliğin neden olduğu nadir kalıtsal bir hastalıktır. Bozulmuş mukosiliyer aktivite, tekrarlayan hava yolu inflamasyonuna, akciğer yetmezliğine ve ilerleyici bronşektaziye yol açabilir (128,129). PSD bazı olgularda situs inversus varlığı ile tanı alır ve bu olgular doğumsal kalp anomalisi riskinin yüksek olduğu Kartagener sendromu olarak

adlandırılır (130,131). PSD'li erkeklerde disfonksiyonel sperm flagellası gözlenmekte ve sıklıkla infertiliteyle ilişkilendirilmektedir (132). PSD tanısı amacıyla RS kompleksinin *RSPH9*, *RSPH4A* ve *RSPH1* mutasyonlarının araştırıldığı bir çalışmada klinik PSD tanılı olgularda *RSPH4A* için biallelik mutasyonlar bildirilmiştir. OMİM'de PSD tip-11 için kalıtım paterni bildirilmiş olmasa da ilgili çalışmalarda biallelik mutasyonların varlığı ve klinik yansıması hastalığın OR kalıtılma ihtimalini düşündürmektedir (133).

### ***HGD Geni***

*HGD* geni, fenilalanin ve tirozinin katabolizmasında rol oynayan bir enzim olan Homogentisik Asit 1,2 Dioksigenazı kodlar. *HGD* geni biallelik patojenik varyantları Alkaptonüri (Alkaptonüri; OR kalıtmı; MIM # 203500) ile ilişkilendirilmiştir. Alkaptonüri hastalığı idrar renginde koyulaşma, ciltte okronotik renk değişikliği ve çeşitli kas iskelet sistemi belirtileri olan ve infertilite ile ilişkisi bildirilmemiş nadir bir metabolik hastalıktır (134).

### ***CD36 Geni***

Lökosit farklılaşma antijeni *CD36* immunolojik olarak hücre adezyon işlevinde görevli olan Platelet glikoprotein IV (Platelet glikoprotein IV eksikliği; OR kalıtmı; MIM # 608404) ile ilişkilidir. *CD36*'nın biallelik patolojik varyantlarının, trombositlerde *CD36* yüzey antijen yokluğu nedeniyle kanama eğilimine sebep olabileceği bildirilmiştir (160).

### ***KLK14 Geni***

Kallikreinler (KLK), polipeptit prekürsörlerin translasyon sonrası işlenmesinde görev alan bir grup serin proteazdır. KLK ailesinin semen koagülasyonu (pıhtılaşma) ve likefaksiyonu (sıvılaşma) kademesinde anahtar rol oynadığı bilinmektedir (135). Semen hiperviskozitesinin, dişi üreme sisteminde spermelerin hareketliliğini, ilerlemesini olumsuz etkilediği ve döllenmeyi bozduğu tanımlanmıştır (136). KLK'lerdeki tanımlanmış patolojilerin semen viskozitesini arttırdığının gösterilmesiyle bu durumun infertilite ilişkili olabileceği görüşünü destekleyen çalışmalar bulunmakta ve sürdürülmektedir. Serin proteaz grubundaki *KLK* gen ailesi erkek infertilitesi ilişkili aday genler arasında gösterilmektedir (137).

### ***DNAH6 Geni***

Dyneinler, mikrotübüller üzerinde siliyer bükülme, hücre içi taşıma ve hücre bölünmesi dahil olmak üzere çeşitli işlemlerde kuvvet ve hareket oluşturan mikrotübül ile ilişkili ATP bağımlı motor protein kompleksleridir *DNAH6 geni*, bir dynein iç kolu bileşeni olarak işlev gören aksonemal dynein ağır zincirini kodlar. *DNAH6* patolojik mutasyonları, insan ve fare hava yolundaki hareketli siliaların fonksiyonunu bozmuştur; ek olarak dynein genlerinin mayoz bölünme için de önemli olduğu gösterilmiştir (138, 139,140). *DNAH6* geni, hem insanlarda hem de farelerde testis, over, beyin ve akciğer gibi silia barındıran dokularda yüksek oranda eksprese edilmektedir. OMİM’de bilinen bir fenotiple ilişkilendirilmemesine rağmen sperm flagellasında morfolojik anomalisi bulunan olgularla yapılan çalışmada biallelik patolojik varyantları saptanan *DNAH6*’nın OR kalıtılan erkek infertilitesi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Yapılan çalışmada *DNAH6*’nın hem resesif olarak hem de muhtemel DNAH1 veya DNAH516 gibi diğer siliyer diskenezi genleri ile trans-heterozigot etkileşimler yoluyla etki edebileceği gösterilmiştir. Dynein ağır zincir ailesinin bir başka üyesi olan DNAH1, spermatozoa’da iç dynein kollarının oluşumu için gereklidir ve flagellar siliar aksonemin biyogenezini için önemlidir (141,142). Yapısal ve işlevsel benzerlikleri göz önüne alındığında, *DNAH6*’nın siliar aksonemin biyogenezini ve kamçı hareketliliğine katkı sağladığı düşünülmekte ve dyneinler erkek infertilitesi için aday genler arasında gösterilmektedir (143).

### ***FAT1 Geni***

*FAT1* geni, vertebrate cadherin-like gen ailesinin bir üyesidir. Hücre göçü, lamellipodia dinamikleri, hücre polaritesinde ve hücre-hücre adezyonlarında rol alır. İnsan spermatozoasında uzun zincirli poliansatüre yağ asitleri (PUFA) tespit edilmiştir. *FAT1*, n-6 PUFA’ları endojen olarak n-3 PUFA’lara dönüştürerek, lipid metabolizmasını etkiler ve mitokondriyal enerji metabolizmasını artırır; böylece lipid birikiminin azalmasına neden olarak, anormal lipid birikiminin ve dislipidemiinin oluşumunu engeller. Doymamış yağ asitleri, sperm plazma zarına, döllenme ile ilişkili zar füzyon olaylarına katılmak için ihtiyaç duyduğu akışkanlığı verir. Membran akışkanlığındaki değişiklikler teorik olarak döllenme süreci için kritik olan sinyal iletim yollarının oluşmasını ve aktivasyonunu engelleyebilir. OMİM’de ilişkili bir fenotip henüz

bildirilmemiş olsa da teorik olarak bu gen erkek infertilitesi için aday olma potansiyeli taşımaktadır (144,145,146).

### ***FLG Geni***

Profilagrin, memeli epidermisinin keratohyalin granüllerinin önemli bir protein bileşenidir. Filagrin (FLG) proteolitik enzimler tarafından profilagrinden dönüştürülür. Patolojik Filagrinler keratinizasyon anomalileri ile ilişkilidir. *FLG* genindeki hem heterozigot mutasyonlar hem de homozigot mutasyonlar OMİM’de İktiyozis vulgaris (Ichthyosis Vulgaris; OR/OD kalıtmı; MIM #146700) ile ilişkilendirilmiştir. İktiyozis vulgaris’in fenotipik spektrumu çok geniştir. Homozigot mutasyonlar veya birleşik heterozigot mutasyonlarda deride belirgin pullanma gibi daha ağır bulgular gözlenmekteyken; monoallelik mutasyonların el içi çizgilerinin belirgin olması ve keratozis pilaris gibi daha hafif bulgularla seyrettiği bildirilmektedir (161).

Olgu 1’de *TSSK2* geninde NM\_053006.4 numaralı transkripte göre tüm veritabanlarında olası patojenik olarak yorumlanan heterozigot c.637T>C varyantı saptanmıştır. Hayvan ve insan çalışmaları *TSSK2* geninin erkek infertilitesi etiyolojisinde yer alabilecek aday genlerden biri olabileceğini göstermiş, ancak henüz OMİM’de bir fenotip ile ilişkilendirilmemiştir. Daha geniş popülasyonlarda yapılacak çalışmalarla genin klinik ilişkisi açıklanabilecektir. Olgunun eşinde olgumuzda saptanan *TSSK2* genine ait varyant bulunmadığı bilinmektedir. Olguda saptanan 2. varyant *TTC21B* geninde NM\_024753.4 numaralı transkripte göre heterozigot c.1546C>T varyantıdır. Saptanan varyant veritabanlarında olası patojenik olarak yorumlanmaktadır. *TTC21B* geni ile ilişkilendirilmiş sendromik olguların (Joubert sendromu) varlığı ve olgunun 1. derece kuzen eşinde de aynı varyantın heterozigot olarak saptanması, ailenin bir gebeliğinde ultrason ile saptanan siliyopati ile uyumlu bulgularını açıklamaktadır. Ailenin 7-8. haftalardaki 4 gebelik kaybı ise bu sonuçlarla henüz direkt olarak ilişkilendirilememiştir. Ailenin bu varyantın homozigot formunun spontan abortus ile ilişkili olabilme olasılığı abortus materyallerinde varyantın araştırılması ile açıklık kazanabilir. Aile en azından bu OR hastalık açısından yani %25 tekrarlama riski açısından bilgilendirildi ve prenatal/preimplantasyon tanı hakkında bilgilendirildi.

Olgu 2’de *HGD* geninde NM\_000187.3 numaralı transkripte göre veritabanlarında patojenik olarak değerlendirilen heterozigot c.175delA mutasyonu saptanmış ve Sanger dizi analizi ile de doğrulanmıştı. İnfertilite ve TGK etiyolojisini

aydınlatamasa da *HGD* ilişkili Alkaptonüri hastalığı OR kalıtım gösterdiğinden ve bunun prenatal tanı/PGD ile önlenabilir bir metabolik hastalık olması nedeniyle çocuk sahibi olmak isteyen diğer aile bireylerinin de taşıyıcılık açısından taranması ile taşıyıcı çiftlere uygun danışma verilebilmesi mümkün oldu. Ek olarak olgu 2’de *CD36* geninde NM\_000072.3 numaralı transkripte göre veritabanlarında patojenik olarak değerlendirilen heterozigot c.949dupA saptanmıştı. Bu duplikasyon Sanger dizi analizi ile de doğrulanmıştı. *CD36* geninin immün yetersizlikle ilişkili olabileceği bildirilmekte ancak TKG ve infertilite etiyolojisi ile henüz ilişkilendirilmemiştir. Olgunun eşinde olgumuzda saptanan *HGD* ve *CD36* genlerine ait varyantların bulunmadığı bilinmektedir.

Olgu 3’te hemizigot saptanan ve veritabanlarına göre Becker Musküler Distrofi hastalığı için patojenik olarak sınıflandırılan daha önce tanımlanmış *DMD* genindeki varyant Sanger dizi analizi ile de doğrulanmıştı. Bu varyantın direkt olarak TKG veya infertilite kliniğini açıklamayacağı düşünüldü. Olgunun Nöroloji kliniğine yönlendirilmesi, aile ağacının genişletilerek klinik ve genetik açıdan aile bireylerinin taranması planlandı. Aynı varyantı taşıdığı belirlenen aile bireylerinin prenatal tanı/PGD seçeneği hakkında bilgilendirilmesi mümkün olacaktır. Olgunun eşinde olgumuzda saptanan *DMD* genine ait varyant bulunmadığı bilinmektedir.

Olgu 4’te *FLG* geninde NM\_002016.2 numaralı transkripte göre veritabanlarında patojenik olarak değerlendirilen heterozigot c.5170G>T varyantı saptanmıştı. Monoallelik varyantların hafif seyirli cilt bulguları ile giden iktiyoz ile ilişkili olduğu bildirildiğinden olgu Dermatoloji kliniğine yönlendirildi. Ancak bu gen ile TKG/infertilite ilişkisi henüz gösterilmemiştir. Bu nedenle daha geniş popülasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Olgunun eşinde olgumuzda saptanan *FLG* genine ait varyant bulunmadığı bilinmektedir.

Olgu 5’te *APOB* geninde NM\_000384.2 numaralı transkripte göre farklı veritabanlarında VUS veya patojenik olarak değerlendirilen heterozigot c.2170G>T varyantı saptanmıştı. *APOB* geni ve erkek infertilitesine ilişkisi henüz belirsizliğini korumaktadır. Ancak erkek infertilitesi ilişkili aday genler arasında yer almaktadır (123,124,125) ve büyük popülasyon verileri ile zamanla daha fazla bilgi sağlanması mümkün olacaktır. Olgunun eşinde olgumuzda saptanan *APOB* genine ait varyant bulunmadığı bilinmektedir.

Olgu 6'da *MAGEA9* geninde NM\_005365.4 numaralı transkriptte heterozigot c.483T>A varyantı ve *NPAS2* geninde NM\_002518.3 numaralı transkriptte heterozigot c.2453G>T varyantı saptanmıştı. Saptanan iki varyant için de veritabanlarında farklı patojenite yorumları gözlenmekle ancak her iki gen de infertilite ilişkili olası aday genler arasında yer almaktadır. Bu varyantlar için aile içi segregasyon analizlerinin planlanması ve sonuçlarının her iki gen için de klinik ilişki hakkında daha fazla bilgi sahibi olunabileceği düşünüldü. Olgunun eşinde olgumuzda saptanan *MAGEA9* ve *NPAS2* genlerine ait varyantların bulunmadığı bilinmektedir.

Olgu 7'de *DNAH6* geninde NM\_001370.1 numaralı transkriptte göre farklı veritabanlarında olası VUS ve patojenik olarak değerlendirilen heterozigot c.4672G>A varyantı saptanmıştı. *DNAH6* geninin kalıtım modeli kesin olarak bildirilmese de bazı çalışmalarda biallelik mutasyonların erkek infertilitesi etiyolojisinde yer alabileceği bildirilmiştir (143). Olgumuzda saptanan heterozigot varyant nedeniyle *DNAH6* geni açısından aile ağacının genişletilmesi ve aile bireylerinde tarama yapılması ile klinik ilişkinin açıklamasına katkı sağlanabileceği düşünüldü. Olgunun eşinde olgumuzda saptanan *DNAH6* genine ait varyant bulunmadığı bilinmektedir.

Olgu 8'de *KLK14* geninde NM\_001311182.1 numaralı transkriptte göre farklı veritabanlarında olası likely benign ve olası patojenik olarak değerlendirilen heterozigot c.656A>G varyantı saptanmıştı. Semen viskozitesi ile ilişkili olduğu bilindiğinden *KLK* gen ailesinin erkek infertilitesi etiyolojisinde etkili olabilecek aday genler arasında yer almaktadır. Bu nedenle ilk aşama aile öyküsünün detaylandırılarak aile içi segregasyon çalışmasının tamamlanması uygun olacaktır. Olgunun eşinde olgumuzda saptanan *KLK14* genine ait varyant bulunmadığı bilinmektedir.

Olgu 9'da *RSPH4A* geninde NM\_001010892.2 numaralı transkriptte göre farklı veritabanlarında VUS veya patojenik olarak değerlendirilen heterozigot c.1105G>C varyantı saptanmıştı. *RSPH4A* geninin kalıtım modeli kesin olarak bildirilmiş olmasa da çalışmalarda biallelik mutasyonların primer silier diskenezi ve dolayısıyla erkek infertilitesi etiyolojisinde sperm hareket fonksiyonu bozukluğuna yol açabileceği düşünülmüştür (132). Öncelikle aynı varyant için aile içi segregasyon analizinin tamamlanması planlanmıştır. Olgunun eşinde olgumuzda saptanan *RSPH4* genine ait varyant bulunmadığı bilinmektedir.

Olgu 10'da *FAT1* geninde NM\_005245.4 numaralı transkriptte göre farklı veritabanlarında likely benign veya patojenik olarak değerlendirilen heterozigot

c.2563G>A varyantı saptanmıştı. Lipit ve mitokondriyal enerji metabolizmasında etkin olan *FAT1* geni ve erkek infertilitesi arasında ilişki olabileceği düşünülüyor olsa da henüz yeterli olgu sayısında çalışma yoktur (145,146). Olgunun eşinde olgumuzda saptanan *FAT1* genine ait varyant bulunmadığı bilinmektedir.

Olgu 3, 6, 7, 8'de *CFTR* geninde heterozigot varyantlar saptanmış olup bu varyantlar biallelik olmadığı için kistik fibroz hastalığı ile ilişkilendirilememiştir. *CFTR* mutasyonu saptanan 4 (biri patojenik, biri olası patojenik ve ikisi VUS kategorisinde) olgumuzda klinik olarak CBAVD fenotipi bulunmadığından ve olguların hiç birinde p.Arg117His varyantı ve cis pozisyonunda 5T varyantı saptanmadığından bu sonuç klinik ilişkili olmayan tesadüfi bulgu olarak değerlendirildi. KF taşıyıcılığının toplumda sık görülmesi (%4) tesadüfi bulgu olma olasılığını güçlendirmektedir (167). Olguların hiç birinin eşinde *CFTR* geninde patolojik varyant saptanmadığı bilindiğinden fetus için bu hastalık açısından artmış risk olmadığı söylenebilir. Ancak KF hastalığında, yeni nesil dizileme tekniği ile gösterilemeyen yaklaşık %2-3 oranında delesyon mutasyonları bildirildiğinden bu olgularımızda MLPA analizi ile delesyon mutasyonlarının dışlanması bundan sonraki çalışma olarak planlanabilir.

Bu tez projesinde maliyet nedeniyle sadece 10 olguda TED tekniği uygulanabilmesine rağmen daha önce infertilite/TGK ile ilişkilendirilmiş aday genlerin saptanması bu genlerin fenotip-genotip ilişkisini güçlendirmiştir. Olguların araştırmaya alınma kriteri olan infertilite/TGK öyküsü dışında 2 olguda başka klinik durumların saptanması tanı veya araştırma amaçlı TED analizi yapılacak olgularda ön genetik danışmanın önemi göstermektedir.

TGK/infertilite kliniğinin etiyolojisinde oligogenik, multifaktöriyel etkenlerin rol aldığı bilinmektedir. Bu nedenle bu olguların TED tekniği ile incelenmesi seçici genleri kapsayan panel çalışmalarına göre daha etkin olacağı bu çalışma kapsamında dahi görülmüştür. Ayrıca özellikle akraba evliliğinin de yaygın olduğu Türkiye gibi toplumlarda artmış OR kalıtmı nadir hastalık riski söz konusu olduğundan TED analizleri fetus için risk artırıcı olası diğer genlerinde araştırılmasına (Olgu 1'de olduğu gibi) olanak sağlamaktadır.

TED analizlerinin limitleri olan, incelenen genlerin ekzonlarının tümünü kapsayamaması, uzun dizilerin ve tekrar bölgelerinin incelenememesi ve gen/gen içi submikroskobik delesyon ve duplikasyonların saptanamaması bu çalışmanın da

limitlerini oluşturdu. Tez mali desteğinin kısıtlı olması ancak 10 olgu çalışılmasına olanak sağlamış, TED analiz limitleri dışında kalan kapsanmayan alanların Sanger dizileme ile tamamlanmasına, gen/gen içi submikroskopik delesyon ve duplikasyonların ilaveten incelenebilmesine olanak sağlayacak yüksek çözünürlüklü mikroarray analizinin uygulanmasına ise olanak sağlayamamıştır. Bu tez kapsamında saptanan patojenik varyantların veri tabanlarına bildirilmesi ile uluslararası araştırmalara katkı sağlayacaktır. Özellikle infertilite ilişkili aday genlerde saptanmış olan varyantlar fenotip-genotip ilişkisine önemli katkı sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında TKG ve infertilitede erkek faktörünün araştırılması açısından literatüre katkısı ve çalışma kapsamındaki ailelere genetik danışmanlık açısından değerli sonuçlar elde ettiğimizi düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Günalp İ. *Fertilite ve Sterilite*, Modern Üroloji Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara, S:1013-1043, 1975.
2. Howards S.S. *Treatment of Male Infertility*, New England J Med 1995, 332:312-17.
3. Turek P.J. *Male Infertility*. Smith' s General Urology, Tanagho EA. Mc Aninch JW. Appleton Lange. 2000:750-87.
4. Speroff L. and Marc A. Fritz.(Eds') *Clinical Gynecological Endocrinology and Infertility*. Seventh Edition, LWW. 2008:1114-1133.
5. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13:37. doi:10.1186/s12958-015-0032-1.
6. Morice, P.. *History of infertility*. Human Reproduction Update, (1995) 1(5), 497–504.
7. Hippocrate (1839-1861) (trans. Littré, E) Of women's diseases, 94 Oeuvres Completes. Bailliere, Paris.
8. Avicenna (trans. Jahier, H. and Noureddine, A.) *Lespoemes de la midtcine*. (1956) Les Belles Lettres, Paris.
9. Anil K. *Dubey Infertility: Diagnosis, Management and IVF* (2012) ( 1st ed.).
10. Zavos P.M. Seminal parameters of ejaculates collected from oligospermic and normospermic patients via masturbations. *Fertil Steril*. 1985;44:517-20.
11. James W.O., David F. Semen Analysis, *Male Infertility*, Urologic Clinics of North America, 1987;14(3).
12. Mann T. *Biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. Monography 2nd. Ed. ,Methuen, London, 1964.
13. *Langman's Medical Embryology*, 11th. Ed, 2010, Ch. 15, p. 235-263.
14. The endocrine control of spermatogenesis, Baillieres *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2000.
15. Schlegel PN HM, editor. *Male reprocutive physiology*. 2004, 8 ed. Philadelphia: Saunders,

16. Hai, Y., Hou, J., Liu, Y., Liu, Y., Yang, H., Li, Z., & He, Z. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014;29:66–75.
17. Neto, F. T. L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2016;59: 10–26.
18. Misell LM, Holochwost D, Boban D, Santi N, Shefi S, Hellerstein MK, et al. A stable isotope-mass spectrometric method for measuring human spermatogenesis kinetics in vivo. *The Journal of Urology*. 2006;175:242-6, discussion 6.
19. Turek P. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Partin AW, Peters CA, editors. *Male reproductive physiology*. Campbell-Walsh urology 11th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2016;p. 516-37.
20. Paniagua R, Nistal M. Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty. *Journal of anatomy*. 1984;139:535-52.
21. Goossens E, Tournaye H. Adult stem cells in the human testis. *Seminars in reproductive medicine*. 2013;31:39-48.
22. de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of andrology*. 2000;21:776-98.
23. Junqueira, L., Carneiro, J., Abrahamsohn, P., *Erkek Üreme Sistemi*. 1 ed, ed. Y. Aytekin, Solakoğlu, S. 2006, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
24. Oko R, Sutovsky P. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *Journal of reproductive immunology*. 2009;83:2-7.
25. Walsh PC. *Campbell's Urology*. 8th ed. USA: Saunders, 2002.
26. Asch R, Simerly C, Ord T, Ord VA, Schatten G. The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Hum Reprod*. 1995;10:1897.
27. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji*. 10. ed. Çavuşoğlu H, çeviri editörü. Yüce Yayınları & Nobel Tıp Kitabevleri. 2001.

28. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, *Hum Reprod.* 2009.
29. T.C. Sağlık Bakanlığı Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü, “Ulusal Aile Planlaması Hizmet Rehberi”, 2005.
30. Aghajanova L. Obstetrics and gynecology residency and fertility needs: national survey results. *Reprod Sci.* 2016.
31. Demirtürk F, Çalışkan A.C. *Kadın İnfertilitesi*. Ed: Erk A, Günalp S. Klinik Jinekolojik Endokrinoloji Ve İnfertilite. Ankara, Güneş Tıp Kitabevi, 2007
32. WHO. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. 5 ed. Organization WH, editor. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
33. Jose-Miller, A. B., Boyden, J. W., & Frey, K. A. *Infertility*. American Family Physician. 2007;849–856.
34. De Kretser, D. Male infertility. *The Lancet.* (1997);349(9054):787–790.
35. Cayan S, Lee D, Black LD, Reijo Pera RA, Turek PJ. Response to varicocelelectomy in oligospermic men with and without defined genetic infertility. *Urology.* 2001
36. Silber, S. J., Van Steirteghem, A. C., & Devroey, P. Sertoli cell only revisited. *Human Reproduction.* 1995;10(5):1031–1032.
37. Dissanayake, D. M. I. H., Keerthirathna, W. L. R., & Peiris, L. D. C. Male Infertility Problem: A Contemporary Review on Present Status and Future Perspective. *Gender and the Genome.* 2019;3.
38. De Souza, D. A. S., Faucz, F. R., Pereira-Ferrari, L., Sotomaior, V. S., & Raskin, S. Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling. *Andrology.* 2017;6(1):127–135.
39. Ali, S, & Hasnain, S. E.. Genomics of the human Y-chromosome. *Gene.* (2003;321:, 25–37.
40. Oates, R. D. The Genetic Basis of Male Reproductive Failure. *Urologic Clinics of North America.* 2008;35(2):257–270.

41. Krausz, C., Hoefsloot, L., Simoni, M., & Tüttelmann, F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*. 2013;2(1):5–19.
42. Jobling, M. A., & Tyler-Smith, C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature Reviews Genetics*. 2003;4(8):598–612.
43. Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Goodfellow, P. N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 1990;346(6281):240–244.
44. Navarro-Costa, P., Plancha, C. E., & Gonçalves, J. Genetic Dissection of the AZF Regions of the Human Y Chromosome: Thriller or Filler for Male (In)fertility? *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010:1–18.
45. Suganthi R, Vijesh VV, Vandana N, Fathima Ali Benazir J. Y chorosomal microdeletion screening in the workup of male infertility and its current status in India. *International Journal of Fertility & Sterility*. 2014:253-66.
46. Hall, N. M., Brown, G. M., Furlong, R. A., Sargent, C. A., Mitchell, M., Rocha, D., & Affara, N. A. *USP9Y* (ubiquitin-specific protease 9 gene on the Y) is associated with a functional promoter and encodes an intact open reading frame homologous to *Usp9x* that is under selective constraint. *Mammalian Genome*. 2003;14(7):437–447.
47. Rosner, A., & Rinkevich, B.. The DDX3 Subfamily of the DEAD Box Helicases: Divergent Roles as Unveiled by Studying Different Organisms and In Vitro Assays. *Current Medicinal Chemistry*. 2007;14(23):2517–2525.
48. Krausz, C., Forti, G., & McElreavey, K. The Y chromosome and male fertility and infertility1. *International Journal of Andrology*. 2003;26(2):70–75.
49. Foresta, C., Moro, E., & Ferlin, A. Y Chromosome Microdeletions and Alterations of Spermatogenesis1. *Endocrine Reviews*. 2001;22(2):226–239.
50. Chai, N. N., Salido, E. C., & Yen, P. H. Multiple Functional Copies of the RBM Gene Family, a Spermatogenesis Candidate on the Human Y Chromosome. *Genomics*. 1997;45(2):355–361.
51. Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Brown, L. G., Minx, P. J., Cordum, H. S., Waterston, R. H., Page, D. C. The AZFc region of the Y chromosome features

- massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nature Genetics*. 2001; 29(3):279–286.
52. Yen, P. H. Putative biological functions of the DAZ family. *International Journal of Andrology*, 2004;27(3):125–129.
  53. Fernandes, S., Paracchini, S., Meyer, L. H., Floridia, G., Tyler-Smith, C., & Vogt, P. H. A Large AZFc Deletion Removes DAZ3/DAZ4 and Nearby Genes from Men in Y Haplogroup N. *The American Journal of Human Genetics*. 2004;74(1):180–187.
  54. Kent-First, M., Muallem, A., Shultz, J., Pryor, J., Roberts, K., Nolten, W. Grosch, J. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Molecular Reproduction and Development*, 1999;53(1): 27–41.
  55. Dohle, G., Colpi, G., Hargreave, T., Papp, G., Jungwirth, A., & Weidner, W. EAU Guidelines on Male Infertility. *European Urology*, 2005;48(5):703–711.
  56. Pavlovich, C. P., King, P., Goldstein, M., & Schlegel, P. N. Evidence of a treatable endocrinopathy in infertile men. *The Journal of Urology*. 2001;165(3):837–841.
  57. Klinefelter's syndrome. *The Lancet*, (1988); 331(8598):1316–1317.
  58. Oates, R. Evaluation of the azoospermic male. *Asian Journal of Andrology*. 2011;14(1): 82–87.
  59. Simoni, M., Kamischke, A., & Nieschlag, E. Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the work-up of male infertility. Initiative for international quality control. *Human Reproduction*. (1998);13(7):1764–1768.
  60. Kawaguchi, T., Minx, P. J., Cordum, H. S., Hillier, L., Brown, L. G., Page, D. C. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. (2003; 423(6942):825–837.
  61. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463–7
  62. Murphy KM, Berg KD, Eshleman JR. Sequencing of genomic DNA by combined amplification and cycle sequencing reaction. *Clin Chem*. 2005;51(1):35–9.

63. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 2014;30(9):418-26.
64. Oliver GR, Hart SN, Klee EW. Bioinformatics for clinical next generation sequencing. *Clin Chem.* 2015;61(1):124-35.
65. Day-Williams AG, Zeggini E. The effect of next-generation sequencing technology on complex trait research. *Eur J Clin Invest.* 2011;41(5):561-7.
66. Dolled-Filhart MP, Lee M, Ou-Yang CW, Haraksingh RR, Lin JC. Computational and bioinformatics frameworks for next-generation whole exome and genome sequencing. *ScientificWorldJournal.* 2013,2013:730210.
67. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL, Committee ALQA. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.
68. O'Flynn O'Brien, K. L., Varghese, A. C., & Agarwal, A. The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertility and Sterility, Role of genetics in azoospermia Urology.* 2011;93(1):1–12.59-
69. Visootsak, J., & Graham, J. M. Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orphanet Journal of Rare Diseases,* 2006; 1(1):42.
70. Çoğulu Ö, *Tıbbi Genetik Klinik ve Laboratuvar.* 2017;p.228-230
71. Johnson, M. D. Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertility and Sterility.* 1998;70(3):397–411.
72. Gonsalves, J., Sun, F., Schlegel, P. N., Turek, P. J., Hopps, C. V., Greene, C., Pera, R. A. R. Defective recombination in infertile men. *Human Molecular Genetics.* 2004; 13(22):2875–2883.
73. Ozdiler E, Aydos K. *Klinik Androloji.* Ankara: Ankara Universitesi Basımevi, 2000
74. Gabriel-Robez, O., Ratomponirina, C., Dutrillaux, B., CarrePigeon, F., & Rumpler, Y. Meiotic association between the XY chromosomes and the autosomal quadrivalent of a reciprocal translocation in 2 infertile men, 46XY t(19:22) and 46XY t(17:21). *Cytogenetics and Cell Genetics.* 1986;43:54 – 160.

75. Marshall Graves, J. A. Human Y Chromosome, Sex Determination, and Spermatogenesis—A Feminist View1. *Biology of Reproduction*. 2000;63(3):667–676.
76. Griffin, D. K., & Finch, K. A. The genetic and cytogenetic basis of male infertility. *Human Fertility*. 2005;8(1):19–26.
77. Noordam, M. J., & Repping, S. The human Y chromosome: a masculine chromosome. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2006;16(3):225–232.
78. Simoni, M., Bakker, E., & Krausz, C.. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *International Journal of Andrology*. 2004;27(4):240–249.
79. Vogt, P. H. Human chromosome deletions in Yq11, *AZF* candidate genes and male infertility: history and update. *Molecular Human Reproduction*. 1998;4(8):739–744.
80. Lee, J. Y., Dada, R., Sabanegh, E., Carpi, A., & Agarwal, A. Role of Genetics in Azoospermia. *Urology*. 2011;77(3):598–601.
81. Chandley, A. C., Ambros, P., McBeath, S., Hargreave, T. B., Kilanowski, F., & Spowart, G.. Short arm dicentric Y chromosome with associated statural defects in a sterile man. *Human Genetics*. 1986;73(4):350–353.
82. Wang, P. J., McCarrey, J. R., Yang, F., & Page, D. C. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nature Genetics*. 2001;27(4):422–426.
83. Ochsenkuhn, R., & De Kretser, D. M. The contributions of deficient androgen action in spermatogenic disorders. *International Journal of Andrology*. 2003;26(4):195–201.
84. Walsh, T., Pera, R., & Turek, P. The Genetics of Male Infertility. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2009; 27(02):124–136.
85. Afzelius, B. Cilia-related diseases. *The Journal of Pathology*. (2004). 204(4), 470–477.
86. Doerksen T, Benoit G, Trasler JM. Deoxyribonucleic acid hypomethylation of male germ cells by mitotic and meiotic exposure to 5-azacytidine is associated with altered testicular histology. *Endocrinology*. 2000;141:3235-3244.
87. Khazamipour N, Noruzinia M, Fatehmanesh P, Keyhanee M, Pujol P. MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-

- obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. *Hum Reprod.* (Oxford, England). 2009;24:2361- 2364.
88. Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., & Krausz, C. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *European Urology*, 2012;62(2):324–332.
  89. *Gilgamiş Destanı*. (2016). (S. Maden, Çev.) İstanbul: İş Bankası Kültür Yayınları.
  90. D.Bettio, A.Venci, N.Rizzi, L.Negri, P.Levi Setti. Clinical and molecular cytogenetic studies in three infertile patients with mosaic rearranged Y chromosomes. *Human Reproduction*. 2006;21(4):972-975.
  91. Yang, Y., Hao, W. Clinical, cytogenetic, and molecular findings of isodicentric Y chromosomes. *Molecular Cytogenetics*. 2019;12(1):55.
  92. Carvalho FM, Wolfgramm EV, Degasperi I, Verbeno BM, Vianna BA, Chagas FF, Perroni AM, Paula F, Louro ID. Molecular cytogenetic analysis of a ring-Y infertile male patient. *Genetics and Molecular Research*. 2007; 6(1):59-66.
  93. Chandley AC, Edmond P, Christie S, Gowans L, Fletcher J, Frackiewicz A, Newton M. Cytogenetics and infertility in man. I. Karyotype and seminal analysis: results of a five-year survey of men attending a subfertility clinic. *Annals of Human Genetics*. 1975; 39(2):231-54.
  94. Elliott DJ, Cooke HJ. The molecular genetics of male infertility. *Bioessays*. 1997;19(9):801-809.
  95. Goncalves C, Cunha M, Rocha E, Fernandes S, Silva J, Ferraz L, Oliveira C, Barros A, Sousa M. Y-chromosome microdeletions in nonobstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *Asian Journal of Andrology*. 2017;19(3):338-345.
  96. Johannisson R, Schwinger E, Wolff H, H, vom Ende V, Löhrs U. The effect of 13,14 Robertsonian translocations on germ-cell differentiation in infertile males. *Cytogenetic and Genome Research*. 1993;63(3):151-155.
  97. L. Gianaroli, M.C. Magli, A.P. Ferraretti, S. Munné, B. Balicchia, T. Escudero, A. Crippa. Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Human Reproduction*. 2002;17(12):3201–3207.
  98. Franck Pellestor, Isabelle Imbert, Brigitte Andréo, Geneviève Lefort. Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal

- rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. *Human Reproduction*. 2001;16(6):1155–1164.
99. Özpak L, Pazarbaşı A . Erkek İnfertilitesinin Sitogenetiği. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2011;20(4): 230-245.
  100. Mark HFL, Sigman M. Cytogenetics of Male Infertility. In: *Medical Cytogenetics*, 1st. Edition, New York: Marcel Dekker. 2000;247-273.
  101. Machev N, Gosset P, Warter S, Treger M, Schillinger M, Viville S. Fluorescence in situ hybridization sperm analysis of six translocation carriers provides evidence of an interchromosomal effect. *Fertil Steril*. 2005;84(2):365-73.
  102. Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Human Genetics*. 2000;106(5):500-5.
  103. Hodžić A, Maver A, Plaseska-Karanfilska D, Ristanović M, Noveski P, Zorn B, Terzic M, Kunej T, Peterlin B. De novo mutations in idiopathic male infertility-A pilot study. *Andrology*. 2021;9(1):212-220.
  104. Fakhro KA, Elbardisi H, Arafa M, Robay A, Rodriguez-Flores JL, Al-Shakaki A, Syed N, Mezey JG, Abi Khalil C, Malek JA, Al-Ansari A, Al Said S, Crystal RG. Point-of-care whole-exome sequencing of idiopathic male infertility. *Genet Med*. 2018; 20(11): 1365-1373.
  105. Askari M, Mohammad Kordi Tamandani D, Almadani N, Totonch M. Strategies for whole-exome sequencing analysis in a case series study of familial male infertility. *Int J Reprod Biomed*. 2020;18(5):375-384.
  106. Okutman O, Rhouma MB, Benkhalifa M, Muller J, Viville S. Genetic evaluation of patients with non-syndromic male infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(11):1939-1951.
  107. Cheung S, Parrella A, Rosenwaks Z, Palermo GD. Genetic and epigenetic profiling of the infertile male. *PLoS One*. 2019;14(3):e0214275.
  108. Kartlaşmış K, Kökbaş U, Sanna B, Alparslan MM, Kayrın L. Sirkadiyen Saatin Epigenetikle İlişkisi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2017;26(1):50-62. doi:10.17827/aktd.280521.
  109. Ramasamy R, Bakırcıoğlu ME, Cengiz C, Karaca E, Scovell J, Jhangiani SN, Akdemir ZC, Bainbridge M, Yu Y, Huff C, Gibbs RA, Lupski JR, Lamb DJ.

- Whole-exome sequencing identifies novel homozygous mutation in *NPAS2* in family with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 2015;104(2):286-91. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.04.001.
110. Rutter J, Reick M, Wu LC, McKnight SL. Regulation of clock and *NPAS2* DNA binding by the redox state of NAD cofactors. *Science*. 2001;293(5529):510-4. doi: 10.1126/science.1060698.
  111. Reick M, Garcia JA, Dudley C, McKnight SL. *NPAS2*: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science*. 2001;293(5529):506-9. doi: 10.1126/science.1060699.
  112. Alvarez JD, Hansen A, Ord T, Bebas P, Chappell PE, Giebultowicz JM, Williams C, Moss S, Sehgal A. The circadian clock protein BMAL1 is necessary for fertility and proper testosterone production in mice. *J Biol Rhythms*. 2008;23(1):26-36. doi: 10.1177/0748730407311254.
  113. Kovanen L, Saarikoski ST, Aromaa A, Lönnqvist J, Partonen T. ARNTL (BMAL1) and *NPAS2* gene variants contribute to fertility and seasonality. *PLoS One*. 2010;5(4):e10007. doi: 10.1371/journal.pone.0010007.
  114. Hodžić A, Ristanović M, Zorn B, Tulić C, Maver A, Novaković I, Peterlin B. Genetic variation in circadian rhythm genes CLOCK and ARNTL as risk factor for male infertility. *PLoS One*. 2013;8(3):e59220. doi: 10.1371/journal.pone.0059220.
  115. Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res*. 2001;61(14):5544-51.
  116. Pinho A, Barros A, Fernandes S. Clinical and molecular characterization of Y microdeletions and X-linked CNV67 implications in male fertility: a 20-year experience. *Andrology*. 2020;8(2):307-314. doi: 10.1111/andr.12686.
  117. Lo Giacco D, Chianese C, Ars E, Ruiz-Castañé E, Forti G, Krausz C. Recurrent X chromosome-linked deletions: discovery of new genetic factors in male infertility. *J Med Genet*. 2014;51(5):340-4. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-101988.
  118. Pinho A, Barros A, Fernandes S. Clinical and molecular characterization of Y microdeletions and X-linked CNV67 implications in male fertility: a 20-year experience. *Andrology*. 2020;8(2):307-314. doi: 10.1111/andr.12686.

119. Shen Y, Xu J, Yang X, Liu Y, Ma Y, Yang D, Dong Q, Yang Y. Evidence for the involvement of the proximal copy of the *MAGEA9* gene in Xq28-linked CNV67 specific to spermatogenic failure. *Biol Reprod.* 2017;96(3):610-616. doi: 10.1093/biolre/iox006.
120. Zhang H, Su D, Yang Y, Zhang W, Liu Y, Bai G, Ma M, Ma Y, Zhang S. Some single-nucleotide polymorphisms of the *TSSK2* gene may be associated with human spermatogenesis impairment. *J Androl.* 2010;31(4):388-92. doi: 10.2164/jandrol.109.008466.
121. Hao Z, Jha KN, Kim YH, Vemuganti S, Westbrook VA, Chertihin O, Markgraf K, Flickinger CJ, Coppola M, Herr JC, Visconti PE. Expression analysis of the human testis-specific serine/threonine kinase (TSSK) homologues. A TSSK member is present in the equatorial segment of human sperm. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(6):433-44. doi: 10.1093/molehr/gah052.
122. Kane JP and Havel RJ. Scriver CR, Beaudet AR, Sly WS, Valle D, Stanbury JB, Wyngaarden JB and Fredrickson DS (eds) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, 1989;pp. 1139–1164.
123. Huang LS, Voyiaziakis E, Markenson DF, Sokol KA, Hayek T and Breslow JL (1995) Apo B knockout in mice results in embryonic lethality in homozygotes and neural tube defects, male infertility, and reduced HDL cholesterol ester and apo A-I transport rates in heterozygotes. *J Clin Invest.* 1995;96:2152–2161.
124. Huang LS, Voyiaziakis E, Chen HL, Rubin EM and Gordon JW (1996) A novel functional role for apolipoprotein B in male infertility in heterozygous apolipoprotein B knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996:10903–10907.
125. Feki NC, Therond P, Couturier M, Limea G, Legrand A, Jouannet P and Auger J. Human sperm liquid content is modified after migration into human cervical mucus. *Mol Hum Reprod.* 2004;10:137–142.
126. Peterlin B, Zorn B, Volk M, Kunej T. Association between the apolipoprotein B signal peptide gene insertion/deletion polymorphism and male infertility. *Mol Hum Reprod.* 2006;12(12):777-9. doi: 10.1093/molehr/gal088.
127. Castleman VH, Romio L, Chodhari R, Hirst RA, de Castro SC, Parker KA, Ybot-Gonzalez P, Emes RD, Wilson SW, Wallis C, Johnson CA, Herrera RJ, Rutman A, Dixon M, Shoemark A, Bush A, Hogg C, Gardiner RM, Reish O, Greene ND, O'Callaghan C, Purton S, Chung EM, Mitchison HM. Mutations in

- radial spoke head protein genes *RSPH9* and *RSPH4A* cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities. *Am J Hum Genet.* 2009;84(2):197-209. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.01.011.
128. Marthin JK, Petersen N, Skovgaard LT, Nielsen KG. Lung function in patients with primary ciliary dyskinesia: a cross-sectional and 3-decade longitudinal study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181(11):1262-8. doi: 10.1164/rccm.200811-1731OC.
  129. Knowles MR, Daniels LA, Davis SD, Zariwala MA, Leigh MW. Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(8):913-22. doi: 10.1164/rccm.201301-0059CI.
  130. Ibañez-Tallon I, Heintz N, Omran H. To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet.* 2003;12 Spec No 1:R27-35. doi: 10.1093/hmg/ddg061.
  131. Kennedy MP, Omran H, Leigh MW, Dell S, Morgan L, Molina PL, Robinson BV, Minnix SL, Olbrich H, Severin T, Ahrens P, Lange L, Morillas HN, Noone PG, Zariwala MA, Knowles MR. Congenital heart disease and other heterotaxic defects in a large cohort of patients with primary ciliary dyskinesia. *Circulation.* 2007;115(22):2814-21. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.649038.
  132. Zariwala MA, Knowles MR, Omran H. Genetic defects in ciliary structure and function. *Annu Rev Physiol.* 2007;69:423-50. doi: 10.1146/annurev.physiol.69.040705.141301
  133. Frommer A, Hjeij R, Loges NT, Edelbusch C, Jahnke C, Raidt J, Werner C, Wallmeier J, Große-Onnebrink J, Olbrich H, Cindrić S, Jaspers M, Boon M, Memari Y, Durbin R, Kolb-Kokocinski A, Sauer S, Marthin JK, Nielsen KG, Amirav I, Elias N, Kerem E, Shoseyov D, Haeffner K, Omran H. Immunofluorescence Analysis and Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia with Radial Spoke Defects. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;53(4):563-73. doi: 10.1165/rcmb.2014-0483OC.
  134. Fernández-Cañón JM, Granadino B, Beltrán-Valero de Bernabé D, Renedo M, Fernández-Ruiz E, Peñalva MA, Rodríguez de Córdoba S. The molecular basis of alkaptonuria. *Nat Genet.* 1996;14(1):19-24. doi: 10.1038/ng0996-19.

135. Yu Y, Prassas I, Diamandis EP. Putative kallikrein substrates and their (patho)biological functions. *Biol Chem*. 2014;395(9):931-43. doi: 10.1515/hsz-2014-0129.
136. Du Plessis SS, Gokul S, Agarwal A. Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013 Jan 1;5:224-31. doi: 10.2741/e610.
137. Marques PI, Fonseca F, Carvalho AS, Puente DA, Damião I, Almeida V, Barros N, Barros A, Carvalho F, Azkargorta M, Elortza F, Osório H, Matthiesen R, Quesada V, Seixas S. Sequence variation at KLK and WFDC clusters and its association to semen hyperviscosity and other male infertility phenotypes. *Hum Reprod*. 2016;31(12):2881-2891. doi: 10.1093/humrep/dew267.
138. Li Y, Yagi H, Onuoha EO, Damerla RR, Francis R, Furutani Y, Tariq M, King SM, Hendricks G, Cui C, Saydmohammed M, Lee DM, Zahid M, Sami I, Leatherbury L, Pazour GJ, Ware SM, Nakanishi T, Goldmuntz E, Tsang M, Lo CW. *DNAH6* and Its Interactions with PCD Genes in Heterotaxy and Primary Ciliary Dyskinesia. *PLoS Genet*. 2016;12(2).doi: 10.1371/journal.pgen.1005821.
139. McNally FJ. Mechanisms of spindle positioning. *J Cell Biol*. 2013 Jan;200(2):131-40. doi: 10.1083/jcb.201210007.
140. Gershoni M, Hauser R, Yogev L, Lehavi O, Azem F, Yavetz H, Pietrokovski S, Kleiman SE. A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. *Genet Med*. 2017;19(9):998-1006. doi: 10.1038/gim.2016.225.
141. 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;94(1):95-104. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.11.017.
142. Sha Y, Yang X, Mei L, Ji Z, Wang X, Ding L, Li P, Yang S. *DNAH1* gene mutations and their potential association with dysplasia of the sperm fibrous sheath and infertility in the Han Chinese population. *Fertil Steril*. 2017;107(6):1312-1318.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.04.007.

143. Tu C, Nie H, Meng L, Yuan S, He W, Luo A, Li H, Li W, Du J, Lu G, Lin G, Tan YQ. Identification of *DNAH6* mutations in infertile men with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Sci Rep*. 2019;9(1):15864. doi: 10.1038/s41598-019-52436-7.
144. Bidu C, Escoula Q, Bellenger S, Spor A, Galan M, Geissler A, Bouchot A, Dardevet D, Morio B, Cani PD, Lagrost L, Narce M, Bellenger J. The Transplantation of  $\omega$ 3 PUFA-Altered Gut Microbiota of fat-1 Mice to Wild-Type Littermates Prevents Obesity and Associated Metabolic Disorders. *Diabetes*. 2018;67(8):1512-1523. doi: 10.2337/db17-1488.
145. Pohlmeier WE, Hovey RC, Van Eenennaam AL. Reproductive abnormalities in mice expressing omega-3 fatty acid desaturase in their mammary glands. *Transgenic Res*. 2011;20(2):283-92. doi: 10.1007/s11248-010-9407-4.
146. Hohos NM, Cho KJ, Swindle DC, Allshouse AA, Rudolph MC, Skaznik-Wikiel ME. Fat-1 Transgene Is Associated With Improved Reproductive Outcomes. *Endocrinology*. 2018 Dec 1;159(12):3981-3992. doi: 10.1210/en.2018-00723.
147. Sue R, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J ve ark. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424.
148. Hong Li Y, Marren A. Recurrent pregnancy loss: A summary of international evidence-based guidelines and practice. *Aust J Gen Pract*. 2018;47(7):432-436. doi: 10.31128/AJGP-01-18-4459.
149. Creasy R. The cytogenetics of spontaneous abortion in humans. İçinde Beard RW, Sharp F, editörler. *Early Pregnancy Loss: Mechanisms and treatment*. London: Springer Verlag; 1988. pp.293-304.
150. Christiansen OB. The epidemiology of recurrent pregnancy loss. İçinde Carp HJA, editör. *Recurrent Pregnancy Loss. Causes, controversies and treatment*. CRC Press. 2015;pp.1-15.
151. Darras BT, Urion DK, Ghosh PS. Dystrophinopathies. 2000 Sep 5 [Updated 2018 Apr 26]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1119/>.

152. Cruz Guzmán Odel R, Chávez García AL, Rodríguez-Cruz M. Muscular dystrophies at different ages: metabolic and endocrine alterations. *Int J Endocrinol*. 2012;2012:485376. doi: 10.1155/2012/485376.
153. Al-Harbi TM, Bainbridge LJ, McQueen MJ, Tarnopolsky MA. Hypogonadism is common in men with myopathies. *J Clin Neuromuscul Dis*. 2008;9(4):397-401. doi: 10.1097/CND.0b013e318176eb55.
154. Peres MA, da Rocha AM, Vannucchi CI, Mendes CM, Cavalcanti PV, Nichi M, Ambrosio CE, Miglino MA, Visintin JA, D'Ávila Assumpção ME. Semen analysis of Golden Retriever healthy dogs and those affected by muscular dystrophy. *Andrologia*. 2014;46(3):277-82. doi: 10.1111/and.12079.
155. Ong T, Marshall SG, Karczeski BA, et al. Cystic Fibrosis and Congenital Absence of the Vas Deferens. 2001 Mar 26 [Updated 2017 Feb 2]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250/>
156. Stuppia L, Antonucci I, Binni F, Brandi A, Grifone N, Colosimo A, De Santo M, Gatta V, Gelli G, Guida V, Majore S, Calabrese G, Palka C, Ravani A, Rinaldi R, Tiboni GM, Ballone E, Venturoli A, Ferlini A, Torrente I, Grammatico P, Calzolari E, Dallapiccola B. Screening of mutations in the *CFTR* gene in 1195 couples entering assisted reproduction technique programs. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(8):959-964
157. Davis EE, Zhang Q, Liu Q, Diplas BH, Davey LM, Hartley J ve ark. *TTC21B* contributes both causal and modifying alleles across the the ciliopathy spectrum. *Nat Genet*. 2011;43:189-196.
158. Stottmann R.W., Tran P.V., Turbe-Doan A., Beier D.R. *TTC21B* is required to restrict sonic hedgehog activity in the developing mouse forebrain. *Dev Biol*. 2009;335:166-178.
159. Tran PV, Haycraft CJ, Besschetnova TY, Turbe-Doan A, Stottmann RW, Herron BJ ve ark. THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nat Genet*. 2008;40:403-410.

160. Yamamoto N, Akamatsu N, Sakuraba H, Yamazaki H, Tanoue K. Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes. *Blood*. 1994;83(2):392-397.
161. Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Evans AT, Goudie DR, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Munro CS, Sergeant A, O'Regan G, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Presland RB, Fleckman P, McLean WH. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet*. 2006;38(3):337-442.
162. Uluğ M, Süşleyici-Duman B, Arvas-Uluğ A, Çamlıbel T. Testiküler azospermili erkeklerde Y kromozomunda azospermi faktör mikrolelesyonlarının polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmesi. *Cerrahpaşa Tıp Derg*. 2006;37:126-130.
163. Green RC, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, Martin CL, McGuire AL, Nussbaum RL, O'Daniel JM, Ormond KE, Rehm HL, Watson MS, Williams MS, Biesecker LG. American College of Medical Genetics and Genomics. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med*. 2013;15(7):565-574.
164. Donat R, McNeill AS, Fitzpatrick DR, Hargreave TB. The incidence of cystic fibrosis gene mutations in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens in Scotland. *Br J Urol*. 1997;79(1):74-77. doi: 10.1046/j.1464-410x.1997.30816.x.
165. De Braekeleer M, Férec C. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Reprod*. 1996;2(9):669-77. doi: 10.1093/molehr/2.9.669.
166. Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Claustres M, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med*. 1995;332(22):1475-80. doi: 10.1056/NEJM199506013322204.
167. Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Krausz C, Tournaye H. Guidelines on Male Infertility. Barcelona. 2019.

## FORMLAR

### BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İstanbul Tıp Fakültesi  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı  
(tel: 0212 414 2000/ 32564-32527-35067-32347)

#### MOLEKÜLER ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

##### Proje Adı: Sebebi Açıklanamayan Erkek İnfertilitesinin Açıklanmasına Tüm Ekzom Analizlerinin Katkısı

İnfertilite bir yıllık korunmasız ilişkiye rağmen doğal yollarla gebelik oluşmaması olarak kabul edilmektedir. İnfertilite yaklaşık olarak her altı çiftten birini etkileyen, sağlıklı genç çiftlerin dahi %10-15’inde görülen, etkilenen aile için olduğu kadar toplum açısından da önemli bir sağlık sorunudur. Erkek infertilitesinin; genetik, anatomik gibi biyolojik faktörlere veya psikolojik travma, sigara ve alkol kullanımı gibi çevresel faktörlere bağlı ortaya çıkabildiği bilinmektedir. İnfertil olan çiftlerde, söz konusu risk faktörlerinden biyolojik kökenli olanların belirlenmesi için rutin testler uygulanmaktadır. Ancak bu testler ile olguların en fazla yarısında patolojiyi açıklayan bir anomali belirlenebilmekte, olguların yarısından fazlasında ise herhangi bir patoloji belirlenmemektedir. Bu risk faktörlerinden genetik kökenli olanların belirlenmesi, ailelere daha sağlıklı bir genetik danışma verebilme ve tedavi süreci açısından önem taşımaktadır. Kromozom anomalileri ve Y mikrodelsiyonu dışlanmış, anatomik ve yapısal olarak bir anomalisi olmayan erkeklerde görülen infertilite nedenlerinin altında büyük oranda moleküler düzeydeki mutasyonların yattığı düşünülmektedir. Moleküler düzeydeki anomaliler, ancak etkilenen gen biliniyor veya tahmin edilebiliyorsa standart moleküler genetik yöntemleriyle (Sanger dizileme, vd) belirlenebilmekte, henüz tanımlanmamış genlere ait moleküler değişimler ise son yıllarda kullanılan yeni nesil dizileme teknolojisi ile saptanabilmektedir. Sitogenetik veya standart moleküler genetik yöntemler ile belirlenemeyen mutasyonların varlığında bu yöntemlerin yetersiz kaldığı ve vakaların “açıklanamayan” olarak adlandırıldığı bilinmektedir. Bu tez kapsamında, sebebi açıklanamayan erkek infertilitesinin Y mikrodelsiyonu ve kromozom anomalileri dışlanmış, anatomik ve yapısal herhangi bir anomalisi olmayan erkek olgularda, infertilite ile ilişkili tek gen mutasyonlarının Tüm Ekzom Dizileme (TED) yöntemi ile araştırılması, patogeneizde rol oynayan genlerin ve mutasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Size ve ailenize yardımcı olmak amacıyla bu durumun tanısında kullanılan testleri öncelikle size ve sizin gibi diğer hastalara kolaylıkla uygulanmasını sağlamak istiyoruz. Bu çalışma sizin gibi sorunları olan bireylerden kan ve doku örnekleri alınarak bu örneklere testler yapmayı planlıyoruz.

Bu çalışmaya katılmaya davet edildiniz fakat karar vermeden önce çalışmanın riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz. Moleküler Araştırmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formunu okuduktan sonra katılmayı kabul ediyorsanız formu imzalamanız gerekmektedir.

##### 1. Projeye katılım için Gerekli Kriterler;

Projeye katılım için en önemli kriter “Sebebi Açıklanamayan İnfertilite” klinik tanısı konulmuş olmasıdır.

##### 2. Yapılacak işlemin tanımı:

Klinik değerlendirmede “Sebebi Açıklanamayan İnfertilite” tanısı konulduğunda yaklaşık 2 ml kan örneği alınması gerekecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir ve gönüllü katılım esastır.

##### 3. Örnek Alımının Olası riskleri:

Kan Örneği alımı;

Rutin testler amacıyla kan örnekleri alınırken EDTA’lı mor kapaklı tüpe alınan örnek bu çalışma amacıyla kullanılacaktır. Bu işleme bağlı; (1) İğne batması sırasında hafif bir acı duyulabilir, (2) iğne batması sonrasında çok nadiren de olsa enfeksiyon gelişebilir.

##### Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler:

Yapılacak testler, sizin ve ailenizdeki diğer bireylerin gelecekte bu genetik hastalıktan etkilenebileceğini ortaya çıkarabilir ve bu bilgi sizde psikolojik sorun yaratabilir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar sizinle paylaşılacaktır. Fakat bu bilgiyi öğrenmeyi tamamen ret edebilirsiniz. Bu çalışma ile elde edilecek genetik bilgiler kesinlikle gizli kalacaktır ve başkaları ile paylaşılmayacaktır, bu bilginin paylaşımı sadece sizin izninizle bağlı olacaktır. Size ait kan ve doku örnekleri sadece bu çalışma için kullanılacaktır.

**Olası yararlar:**

Bu çalışmanın esas amacı sizde saptanan hastalığa neden olan genetik faktörleri öğrenmektir. Biz bu aşamada henüz yapılacak testlerin, size ve ailenize doğrudan ya da dolaylı bir yararının olup olmayacağını bilmiyoruz. Fakat kesin olan bu çalışmalar tamamlandığında bu hastalığın nedenleri konusunda daha çok şey öğrenebileceğimiz ve böylece hem sizlere hem de gelecekte bu tür hastalara daha çok yardımcı olabileceğimizeyizdir.

**Diğer seçenekler:** Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmam tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekme hakkına da sahipsiniz.

**Hastanın/Katılımcının Beyanı**

Sayın Dr ..... tarafından .....(anabilim dalı adı, ünite adı vb.)’da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalmaması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağını bilinceydim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle oluşabilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi girişimin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi girişimler ile ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim.)

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; mesai saatleri içinde, Prof. Dr. Seher Başaran ve Dr. Hamdi Kale’yi +902124142000/32327-32564 nolu telefon ve İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’ndan arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

**GÖNÜLLÜ ONAM FORMU**

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullar söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-Soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no, faks no,...)

Gönüllünün eşi Adı-Soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no, faks no,...)

Sebebi Açıklanamayan Erkek İnfertilitesinin Açıklanmasına Tüm Ekzom Analizlerinin Katkısı projesi kapsamında alınan biyolojik örneklerimin;

- Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.
- İlerde yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı

**Tarih:**

**İmzası**

Katılımcıların: **Adı-Soyadı**

**Doğum tarihi**

**İmza**

Aile üyesi

Aile üyesi

Aile üyesi

Aile üyesi

\*Araştırma amaçlı DNA için kan alınan hastalara imzalatılmalıdır.

**HASTA İZLEM FORMU****İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi****Tıbbi Genetik Anabilim Dalı****Sebebi Açıklanamayan Erkek İnfertilitesinin Açıklanmasına Tüm Ekzom Analizlerinin Katkısı  
Projesi****Hasta Takip Formu**

T.C. Kimlik No:

Tarih:

Olgu No:

Ad-Soyad:

D.T./Yaşı:

Cinsiyet:

Adres Bilgileri:

Tel:

Protokol no:

DNA no:

Özgeçmiş:

Akrabalık:

Soygeçmiş:

Öykü:

Aile ağacı:

Fizik Muayene:

Tetkikler:

Karyotip:

Moleküler analizler:

Diğer: