

Anormal Sperm Motilitesine Bağlı Erkek İnfertilitesinde Mitokondriyal A3243G Mutasyonunun Rolü

THE ROLE OF A3243G MITOCHONDRIAL MUTATIONS IN MALE INFERTILITY WITH ABNORMAL SPERM MOTILITY

Elçin BORA¹, Özlem GİRAY BOZKAYA², Esra ATAMAN¹, Tufan ÇANKAYA¹, Aykut KEFİ³, Ayfer ÜLGENALP¹, Ferda ÖZKINAY⁴

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

² Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Genetik Bilim Dalı

³ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı

⁴ Ege Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

ÖZ

Amaç: İnfertil çiftlerin yaklaşık yarısında sebep erkeğe bağlı faktörlerdir. Erkek infertilitesinde en sık nedenler; kromozomal anomaliler, Y kromozom mikrolelesyonları ve hormon/reseptör anomalileri gibi genetik faktörlerdir. Son zamanlarda yapılan incelemeler ışığında, sperm motilite bozuklukları erkek infertilitesinde önemli bir neden haline gelmiştir. Sperm fonksiyonunda sperm mitokondrisi önemli bir role sahiptir ve mtDNA'da oluşan genetik değişimler normal fertilizasyonu etkilemektedir. Araştırmamızda, en sık görülen mitokondriyal mutasyonlardan biri olan A3243G'nin, abnormal sperm motilitesi nedeniyle oluşan erkek infertilitesindeki rolünü saptamayı amaçladık.

Yöntem: Anormal sperm motilitesi bulunan 49 infertil erkek ve 22 fertil erkeğin semen ve periferik kanından mtDNA A3243G mutasyon analizi yapıldı. Anormal sperm motilitesi olan olgularda, yaş, sigara alışkanlığı ve varikosel gibi diğer faktörler de sorgulandı.

Bulgular: İnfertil ve fertil olguların hiçbirinde bu mutasyona rastlanmadı.

Tartışma ve sonuç: Çalışmamızın sonucu A3243G mutasyonunun sperm motilitesi üzerinde pek bir etkisi olmadığını gösterse de, olgu sayımızın az olması ve Türk popülasyonunun heterojen olması bu duruma yol açmış olabilir.

Anahtar Kelimeler: mutasyon, infertilite, mitokondri, A3243G mitokondriyal mutasyon, MTL1 geni

ABSTRACT

Objective: Male factor is responsible from nearly half of the infertility cases. Genetic factors such as chromosomal anomalies, Y chromosomal microdeletions, hormonal and/or receptor anomalies are the most common causes of male infertility. Sperm motility anomalies are also gaining importance among the causes being investigated recently. Since sperm mitochondria plays a significant role in sperm function, genetic changes in mtDNA affect normal fertilization. Therefore, we tried to detect the role of A3243G mutation, one of the most common

Elçin BORA

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik AD
İZMİR

mitochondrial mutations, in male infertility cases caused by abnormal sperm motility.

Methods: A3243G mutation in mtDNA was studied in semen and blood samples of 22 normal male and 49 infertile cases with abnormal sperm motility. Other factors such as age, smoking habits and presence of varicocele were also investigated in cases with abnormal sperm motility.

Results: A3243G mutation was not observed in any of the samples.

Discussion and conclusion: We studied A3243G mutation in infertile males with abnormal sperm motility, but we did not detect any association of this mutation with sperm motility. Small number of investigated cases or heterogeneity of our population could be regarded as the reasons of this result.

Keywords: mutation, infertility, male, mitochondria, A3243G mitochondrial mutation, MTL1 gene

Batı toplumlarında erkeklerin yaklaşık %25'i infertilite nedeniyle kliniklere başvurmaktadır ve sağlıklı erkeklerin %8-10'unda subfertilite bulunmaktadır (1-3). İnfertil çiftlerin yaklaşık yarısında sorun erkeklerde ve infertil erkeklerin %30-40'ında neden tam olarak tespit edilememektedir (4). Olguların çoğunda genetik faktörler sorumludur (5). Sperm kalitesinde, sperm motilitesi önemli bir belirteçtir. Türler arasında spermatozoon motilitesi üzerine çok fazla bilgi bulunmasına rağmen, insan flagella fizyolojisi ve patofizyolojisi ile ilgili bilgiler oldukça kısıtlıdır (6-7). Motilite anomalisi (astenozoospermi) izole bir eksiklik olarak erkek subfertilitesi olarak değerlendirilen hastaların yaklaşık %24'ünde saptanmaktadır ve bu, hastaların %55'inde sperm miktarı, motilite ve morfolojideki kombine defektin bir parçasıdır (8). Kombine defekte sahip hastalardaki motilite anomalisi, çoğunlukla spermatogenezisteki defektlere bağlıdır. Diğer yandan, flagellar fonksiyonlarda sonradan kazanılan veya konjenital olan defektler, izole astenozoospermisi olan hastalarda daha olası faktörlerdir.

Mitokondriyal transfer RNA lösün 1 (MTTL1) geni, mitokondriyal transfer RNA (tRNA)'yı kodlayan önemli genlerden biridir. Bu gendeki mutasyonlara bağlı olarak, mitokondriyal solunum zincirindeki disfonksiyon nedeniyle mitokondriyal protein sentezi bozulur. Mitokondriyal tRNA, 3230-3304 arasındaki nükleotidlerce lösine kodlanır ve 3243. pozisyonadaki adenin nükleotidinin guanine dönüşümü mitokondriyal genlerde gözlenen en yaygın mutasyonlardan biridir. Ayrıca bu mutasyon, mitokondriyal DNA (mtDNA)'daki patojenik nokta mutasyonlarından biridir, heteroplazmik ve genellikle mitokondriyal ensefalomiyopati-laktik asidoz-

inme benzeri epizotlar (MELAS) sendromu ile ilişkilidir (9-11). Hastalığın semptomları biyokimyasal olarak ortaya çıkmadan önce mutant mtDNA'nın normal mtDNA'ya oranı %85'in üzerinde olmalıdır (12). Bu mutasyon, farklı dokulardaki heteroplazmi oranı ve henüz net olarak tespit edilememiş nükleer genlerin bir sonucu olarak değişken fenotipik bulgulara yol açar (13). Hastalığın prognozu nesiller arasında veya aynı nesildeki farklı bireyler arasında değişkenlik gösterebilir (14).

Sperm motilitesinde mitokondriyal fonksiyon önemli olduğu için, çalışmamızda, sperm motilite bozukluğuna bağlı infertil olan erkeklerin mtDNA'sında, A3243G mutasyonu ile sperm motilitesi arasında bir ilişki olup olmadığını bulmayı amaçladık.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada, onayları alınmış düşük sperm motilitesi olan 57 subfertil erkek ve 23 fertil erkek kontrolden semen ve periferik kan örnekleri toplanmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Bölümü'ne infertilite nedeniyle başvuran ve androloji laboratuvarında yapılan semen analizleri sonucunda düşük sperm motilitesi saptanan subfertil erkekler seçilmiştir. Semen analizleri, WHO (World Health Organisation) kriterlerine (1999) göre incelenmiştir. Anormal sperm motilitesi bulunan olgularda, yaş, sigara alışkanlığı ve varikosel olup olmadığı da sorgulanmıştır.

Hastaların ve kontrol grubu olgularının periferik kan örnekleri potasyum EDTA (K₃EDTA)'lı tüplere alınmıştır ve DNA izolasyonu 10 ml kan örneklerinden standart prosedüre uygun bir şekilde manuel olarak tuzda çöktürme yöntemi ile yapılmıştır.

Semenden DNA izolasyonu için *Roche* doku izolasyon kiti kullanılmıştır. Semen örnekleri çalışmanın başlangıcında elde edilmiştir ve -20°C 'de saklanmıştır.

Tüm örnekler A3243G allelik varyasyonu için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon enzim uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi ve sonrasında poliakrilamid jel elektroforezi ile, daha önceden tarif edildiği şekilde taranmıştır (15).

Olguların kan örnekleri, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Komisyonu tarafından onay alındıktan sonra toplanmaya başlanmıştır ve hem hasta gruptan, hem de kontrol grubundan bilgilendirilmiş gönüllü onam formları alınmıştır.

SONUÇLAR

Çalışma süresince, %66,7'si kontrol grubundan olan 12 erkeğin semen DNA'ları izole edilememiştir. İnfertil erkeklerin ortalama yaşı $35,8 \pm 13,2$ yıldır ve kontrol grubu ile yaş ortalaması benzerdir ($p > 0,05$). Subfertil olan 49 erkeğin 20'sinde değişik derecelerde varikozel mevcuttur ve kontrol grubunda varikozel olan olgu yoktur. Bu durum istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Ortalama sperm viabilite değeri infertil grupta %73,3, kontrol grubunda %89,6 idi ve istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sigara içme oranı infertil grupta %63,3, kontrol grubunda ise %40,9'du ($p = 0,067$).

Her iki grupta da A3243G mutasyonuna rastlanmadı.

TARTIŞMA

Erkek infertilitesinde en sık karşılaşılan sorunlar kromozomal bozukluklar, Y kromozom mikrodelsyonları ve hormon/reseptör problemleridir (16,17). Bunların dışında, erkek infertilitesine neden olabilecek diğer bir sorun olan sperm motilite bozuklukları son yıllarda önem kazanmıştır. Bu çalışmada, infertiliteye neden olan sperm motilite anomalileri incelenmiştir. Çalışma grubumuzda ana sorun sperm motilite bozuklukları olduğu için, infertiliteye neden olan diğer problemler ele alınmamıştır.

Hereditör ve çevresel faktörler sperm motilitesini etkileyebilir. Ancak, kromozomal bozukluklar ve Y kromozom mikrodelsyonları izole motilite bozukluklarında belirgin bir rol oynamaz. Azospermi ve

oligozoospermi Y kromozom mikrodelsyonlarında görülebilirken, kromozomal bozukluklar çoğunlukla anormal sperm üretimine neden olur (18,19). Sperm mitokondisi sperm fonksiyonunda önemli bir rol oynadığından, mtDNA'da meydana gelen genetik değişiklikler normal fertilizasyonu etkileyebilir. Bu genetik değişiklikler mtDNA'daki patojenik mutasyonlar veya daha yaygın varyantlar olabilir. Mitokondriyal DNA anneden kalıtıldığı için mtDNA ile ilişkili hastalıklar sadece erkekleri etkiler (20). Mitokondriyal bir hastalık olan MELAS sendromuna neden olan mutasyonlardan biri olan A3243G mutasyonuna sahip erkeklerde sperm motilitesinin azalabildiği saptanmıştır (21). Karşıt görüşler de bulunmasına rağmen, mtDNA'daki tek veya birkaç mutasyonun sperm disfonksiyonuna neden olduğu yönünde görüşler de vardır (22,23). Özellikle mitokondriyal hastalık tanısı almış erkeklerde sperm motilite problemi olabileceği düşünülerek bu yönde tetkik yapılması uygun olabilir. Erkek infertilitesi ve nükleus tarafından kodlanan mtDNA polimerazdaki spesifik alleller arasında da bir bağlantı vardır. Mitokondriyal genetik temele bağlı olan oksidatif fosforilasyon aktivitesindeki farklılıklar, direkt olarak sperm motilite bozukluklarıyla ilişkilidir (24).

Bu çalışmada, sperm motilite bozukluklarında mtDNA A3243G mutasyonunun rolü olup olmadığını araştırmayı hedefledik. Bu mutasyonun MELAS sendromu, progresif eksternal oftalmopleji (PEO) ve diabetes mellitus gibi farklı fenotipik yansımaları olabilir (10,25,26). Ayrıca, bu mutasyon daima heteroplazmiktir ve mutasyona maruz kalan mtDNA'ların difüzyonu, bu mutasyon sonucu oluşan farklı fenotipleri saptamada önemlidir.

Yaşlanmanın sperm motilitesini etkilediğini destekleyen veya karşı çıkan görüşler olmakla birlikte, ileri yaşın negatif etkisi olduğu daha aşikârdır (27). Babanın ilerleyen yaşı ve sperm kalitesinin azalmasıyla birlikte sperm motilitesi de azalır. Sperm motilitesinin enerji gereksinimi mitokondriden sağlanır. İlerleyen yaşla mitokondride deformasyon başlar ve bu deformasyonun artmasıyla sperm motilitesi için enerji gereksinimi azalır, motilite problemleri ortaya çıkar. Amerikan Fertilite Derneği, sperm donasyonu yapılacak kişilerin yaşını maksimum 50 olarak önermektedir. Çalışmamızdaki

infertil grupta yaşın motiliteyi etkilediği görülmedi. Çünkü sadece üç olgu 50 yaşın üzerindeydi ve ortalama yaş 36'ydı.

Daha önceden yapılan birçok araştırmaya göre, sigara sperm konsantrasyonunu etkilemektedir ve normal morfolojideki motiliteyi azaltmaktadır (28). Sigara içenlerde sperm kalitesini inceleyen 27 araştırmadan elde edilen metaanaliz sonuçlarına göre, sperm konsantrasyonu %13, motilite %10 azalmış bulunmuş ve normal morfolojide %8 deformasyon olduğu görülmüş (29). Sigara içenlerin oranı infertil grupta %63,3, kontrol grubunda %40,9 idi. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da, sigara içme oranı infertil grupta 1,5 kat fazlaydı. Buna göre, sigara içme anormal sperm motilitesi ile ilişkili olabilir.

Genel varikozel oranı yetişkin erkeklerde %15-22'dir ve bu oran infertilitesi olanlarda %30-40'dır (30, 31). Varikozel, testiste atrofiye neden olarak ve sperm miktarını azaltarak subfertiliteye neden olabilir. Anormal semen analizi olan infertil erkeklerde varikozel oranı %25 civarındadır (32). Sekonder infertilitesi olan erkeklerde ise varikozel oranı %69-81'dir, ancak varikozel olan olgularda fertilitite oranı %80 kadardır (34). Çalışmamızda, 49 infertil erkeğin 20'sinde farklı derecelerde varikozel mevcuttu. Bunların dokuzu bilateral, geri kalanı sol yerleşimliydi ve sadece dört olguda grade 3 varikozel vardı.

Erkek infertilitesinde mitokondriyal disfonksiyon önemli bir nedendir (35). Yapılan birçok çalışmada, astenospermik kişilerde spermin orta kısmının daha kısa ve mitokondriyal kıvrımların daha az olduğu görülmüştür. Mitokondriyal hacim ile sperm uzunluğu ve spermdeki flagellar vuruş uzunluğu arasında bir bağlantı olduğu da saptanmıştır (36). Primer mitokondriyal hastalığı olanlarda sperm motilitesinin daha az olduğu ve kontrol olgularına oranla astenospermik kişilerde mtDNA mutasyon oranlarının daha yüksek olduğu bulunmuştur (22).

Yine bir çalışmada, A3243G mutasyonunu taşıyanlarda, reproduksiyon oranı ve ortalama fertilitite değerleri genel popülasyon ile benzer bulunmuş (37). Ancak diğer birçok araştırma, bu mutasyonun farklı fenotipik etkileri üzerine odaklanmıştır (25,38,39). Diğer

bir yandan, bu durum, motilite bozukluğuyla giden primer erkek infertilitesinde hala net olarak ortaya konulamamıştır ve A3243G mutasyonu ile motilite arasındaki ilişki tam olarak tanımlanmamıştır.

Sonuç olarak, A3243G mutasyonunu anormal sperm motilitesi olan infertil erkeklerde araştırdık, fakat sperm motilitesi ile bu mutasyon arasında herhangi bir ilişki saptamadık. Bu nedenle, elimizdeki verilere göre nedeni tam olarak saptanamayan erkek infertilitesi olgularında A3243G mutasyonu bakılmasını önerememekteyiz. Bu durum, popülasyonumuzun heterojen olması ve olgu sayımızın az olmasından kaynaklanmış olabilir.

Anormal sperm motilitesi olan infertil olgulardaki daha fazla mtDNA'nın inceleneceği daha büyük çalışmalar, erkek infertilitesinde mitokondriyal mutasyonların rolünü anlayabilmemizi sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bhasin S, De Kretser, DM, Baker, HW. Clinical review 64: pathophysiology and natural history of male infertility. J Clin Endocrinol Metab 1992; 79:1525-9.
2. De Kretser DM. Male Infertility. Lancet.1997; 349:787-90.
3. Skakkebaek NE, Giwercman A, de Kretser D. Pathogenesis and management of male infertility. Lancet. 1994; 343:1473-79.
4. Leifke E, Nieschlag E. Male infertility treatment in the light of evidence-based medicine. Andrologia. 1996;28 (Suppl 1):23-30.
5. Rucker GB, Mielnik A, King P, et al. Preoperative screening for genetic abnormalities in men with non-obstructive azoospermia before testicular sperm extraction. J Urol 1998;160:2068-71.
6. Brokaw CJ. Regulation of sperm flagellar motility by calcium and cAMP dependent phosphorylation. J Cell Biochem 1987; 35:175.
7. Tezer M, Küçükdurmaz F, Kadioğlu A. Mikrotese (mikroskopik Testiküler Sperm Ekstraksiyonu). Türkiye Klinikleri J Urology-Special Topics 2008; 1(1):91-97.

8. Lipshultz L. Subfertility. In Kaufman J, editor: *Current Urologic Therapy*, Philadelphia, WB Saunders, 1980.p.127-39.
9. Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, et al. Respiration-deficient cells are caused by a single point mutation in the mitochondrial tRNA-leu (UUR) gene in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS). *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49:590-9.
10. Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA-leu (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature.* 1990; 348:651-53.
11. Schon EA, Bonilla E, DiMauro S. Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerget Biomemb.* 1997; 29:131-49.
12. Chinnery PF, Taylor DJ, et al. No correlation between muscle A3243G mutation load and mitochondrial function in vivo. *Neurology.* 2001; 56:1101-04.
13. Torroni A, Campos Y, Rengo C, et al. Mitochondrial DNA Haplogroups Do Not Play a Role in the Variable Phenotypic Presentation of the A3243G Mutation. *Am J Hum Genet.* 2003; 72:1005-12.
14. Manouvrier S, Rotig A, Hannebique G, et al. Point mutation of the mitochondrial tRNA (leu) gene (A3243G) in maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy, diabetes mellitus, renal failure, and sensorineural deafness. *J Med Genet.* 1995; 32: 654-56.
15. Huang CC, Chen RS, Chen CM, et al. MELAS syndrome with mitochondrial tRNA^{Leu} (UUR) gene mutation in a Chinese family. *J of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry.* 1994; 57:586-589.
16. Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, et al. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Human Reproduction.* 2002; 17:2600-14.
17. Dohle GR, Halley DJ, VanHemel JO, et al. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Human Reproduction.* 2002; 17:13-16.
18. Mc Elreavey K, Krausz C, Bishop CE. The human Y chromosome and male infertility. In Mc Elreavey K (eds.): *The Genetic Basis of Male Infertility*. Heidelberg, Germany: Springer, 1999; p.211-17.
19. Huang V, Lamb DJ, Kim ED, et al. Germ-cell nondisjunction in testes biopsies of men with idiopathic infertility. *Am J Hum Genet.* 1999; 64:1638.
20. Sanchez CD, Ruiz-Pesini E, Lapen̄a AC, et al. Mitochondrial DNA Content of Human Spermatozoa, *Biology of Reproduction.* 2003; 68:180-85.
21. Folgero T, Torbergsen T, Oian P. The 3243-MELAS mutation in a pedigree with MERRF. *Eur Neurol.* 1995; 35:168-171.
22. Kao SH, Chao HT, Wei YH. Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977 bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biol Reprod.* 1995; 52:729-36.
23. Reynier P, Chretien MF, Savagner F, et al. Long PCR analysis of human gamete mtDNA suggests defective mitochondrial maintenance in spermatozoa and supports the bottleneck theory for oocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 252:373-77.
24. Ruiz-Pesini E, Lapena AC, Diez C, et al. Seminal quality correlates with mitochondrial functionality. *Clin Chim Acta.* 2000; 300:97-105.
25. Moraes CT, Ciacci F, Silvestri G, et al. Atypical clinical presentations associated with the MELAS mutation at position 3243 of human mitochondrial DNA. *Neuromuscul Disord.* 1993; 3:43-50.
26. Wei YH, Kao SH. Mitochondrial DNA mutation and depletion are associated with decline of fertility and motility of human sperm. *Zoological studies.* 2000; 39:1-12.
27. Hellstrom WJ, Overstreet JW, Sikka SC, et al. Semen and Sperm Reference Ranges for Men 45 years of age and older. *J Androl.* 2006; 27(3):421-8.
28. Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, et al. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol.* 1995; 154(3):1030-34.

29. Vine MF. Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl.* 1996; 19(6):323-37.
30. Kursh ED. What is the incidence of varicocele in a fertile population? *Fertil Steril.* 1987; 48(3):510-11.
31. Cockett ATK, Takihara M, Cosentino MJ. The varicocele. *Fertil Steril.* 1984; 41:1-12.
32. Nieschlag E, Hertle L, Fishedick A, Behre HM. Treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum Reprod.* 1995; 10(2):347-53.
33. Gorelick JL, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril.* 1993; 59:613-16.
34. Pinto KJ, Kroovand RL, Jarow JP. Varicocele related testicular atrophy and its predictive effect upon fertility. *J Urol.* 1994; 152:788-90.
35. St. John JC, Cooke ID, Barratt CLR. Mitochondrial mutations and male infertility. [Letter]. *Nat Med.* 1997; 3:124-5.
36. Mundy AJ, Ryder TA, Edmonds DK. Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Hum Reprod.* 1995; 10:116-9.
37. Moilanen JS, Majamaa K. Relative fitness of carriers of the mitochondrial DNA mutation 3243ArG. *Eur J Hum Genet.* 2001; 9:59-62.
38. Deschauer M, Muller T, Wieser T, et al. Hearing impairment is common in various phenotypes of the mitochondrial DNA A3243G mutation. *Arch Neurol.* 2001; 58:1885-88.
39. van den Ouweland JM, Maechler P, Wollheim CB, Attardi G, Maassen JA. Functional and morphological abnormalities of mitochondria harbouring the tRNA (LeuUUR) mutation in mitochondrial DNA derived from patients with maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) and progressive kidney disease. *Diabetologia.* 1999; 42:485-92.