

İleri Oligoastenoteratozoospermik Hastaların Semen Örneklerinde Sperm DNA Metilasyonlarının Araştırılması

Investigation of Sperm DNA Methylations in Semen Samples of Advanced Oligoastenoteratozoospermic Patients

Gizem KAYA¹, Sibel YILMAZ¹, Mehmet Murad BAŞAR², Tülay İREZ³

GK: [0000-0003-2896-623X](https://orcid.org/0000-0003-2896-623X) SY: [0000-0002-9930-3567](https://orcid.org/0000-0002-9930-3567) MB: [0000-0002-4732-1923](https://orcid.org/0000-0002-4732-1923) Tİ: [0000-0001-8272-4931](https://orcid.org/0000-0001-8272-4931)

¹İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, İstanbul, Türkiye

²Memorial Şişli Hastanesi, Tüp Bebek Merkezi, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

Öz

Amaç: Epigenetik değişimlerin, sperm kalitesini ve verimliliğini etkileyebileceği bilinmektedir ve bu nedenle spermin klinik değerlendirilmesi için epigenetik işaretlerin yararlı olabileceği düşünülmüştür. Bunun için de belirlenen 3 hedef genin (*TBL1XR1*, *SPATA5* ve *SPATA7*) araştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada, epigenetik işaretler ile ileri oligoastenoteratozoospermik örnekleri ile normozoospermik örnekler arasında DNA metilasyon farklılıkları açısından karşılaştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 20 normospermik ve 20 ileri oligoastenoteratozoospermik olgudan semen örneği toplandı. Toplanan semen örneklerinin histolojik analizleri gerçekleştirildi. Histolojik analizlerin ardından belirlenen örnekler DNA Metilasyon kiti kullanılarak iki grup arasında metilasyon farklılığını gözlemlemek amacıyla sekanslama yapıldı.

Bulgular: Çalışmada yapılan histolojik analizlerin sonuçlarına göre sperm maturasyonu ileri oligoastenoteratozoospermik olgularda düşük bulunmuştur ve DNA fragmantasyonda iki grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Sekanslama sonucunda çalışılabilen az sayıda normospermik kontrol ve oligospermik örneklerde anlamlı dizilime sahip olan kısımlarında nükleotid farkı bulunmadığından metilasyonu etkileyecek bir fark belirlenmemiştir.

Tartışma ve Sonuç: Oligoastenoteratozoospermi (OAT) olguları hormonal veya testiküler fonksiyon bozuklukları ile ortaya çıkarlar ve OAT grubunda sperm DNA fragmantasyonu ve maturasyon kusurları yüksektir. Fakat erkek faktörlü infertilitenin moleküler temeli tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada sperm protaminasyonu ile epigenetik mekanizmaların ilişkisi ve sperm DNA fragmantasyonu mekanizmalarında epigenetiğin rolünün araştırılması konusu ele alınmıştır. Çalışmanın sonucunda belirlenen genler için tasarlanan primerlerle bisülfid dönüşümü gerçekleştirilen örneklerde *TBL1XR1* ve *SPATA5* genlerinde istenilen bant profillerine ulaşılamadı. *SPATA7* uygun büyüklükte bant görüldü fakat sekanslama sonucunda anlamlı metilasyon farklılığı belirlenmemiştir. Yapıtığımız çalışmada farklı genler ve metotlar kullanılarak metilasyonun infertilite üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada yapılacak olan diğer çalışmalara gelecek teşkil edecektir.

Anahtar Kelimeler: Metilasyon, Epigenetik, DNA, Erkek İnfertilitesi

Abstract

Aim: It is known that epigenetic changes can affect sperm quality and fertility, and therefore it was thought that epigenetic markers could be useful for clinical evaluation of sperm. It was aimed to investigate the 3 target genes (*TBL1XR1*, *SPATA5* and *SPATA7*) determined in this. In this study, epigenetic markers were compared in terms of DNA methylation differences between advanced oligoastenoteratozoospermic samples and normozoospermic samples.

Material and Methods: In our study, semen samples were collected from 20 normospermic and 20 advanced oligoastenoteratozoospermic cases. Histological analyzes of the collected semen samples were performed. The samples determined after histological analyzes were sequenced using the DNA Methylation kit to observe the methylation difference between the two groups.

Results: According to the results of histological analyzes performed in the study, sperm maturation was found to be low in advanced oligoastenoteratozoospermic cases and no significant difference was found between the two groups in DNA fragmentation. As a result of sequencing, there was no nucleotide difference in the parts with significant sequences in the few normospermic control and oligospermic samples that could be studied, so no difference that would affect methylation was determined.

Discussion and Conclusion: Oligoastenoteratozoospermia (OAT) cases present with hormonal or testicular dysfunctions and sperm DNA fragmentation and maturation defects are high in the OAT group. However, the molecular basis of male factor infertility is not fully understood. In this study, the relationship between sperm protamination and epigenetic mechanisms and investigating the role of epigenetics in sperm DNA fragmentation mechanisms are discussed. As a result of the study, the desired band profiles in *TBL1XR1* and *SPATA5* genes could not be reached in the samples in which bisulfite conversion was performed with the primers designed for the determined genes. *SPATA7* bands of appropriate size were seen, but no significant methylation difference was detected as a result of sequencing. In our study, the effects of methylation on infertility were investigated using different genes and methods. It will be the future of other studies to be done in this study.

Keywords: Methylation, Epigenetics, DNA, Male Infertility

Giriş

İnfertilite, çiftlerin %10-15'ini ilgilendirir ve modern toplumun artan bir sorunudur. İnfertilitenin üçte biri erkek faktörlüdür (1). Erkek infertilitesinde yeterli sayıda spermatozoa üretilememesi, yetersiz motilite ve anormal morfoloji durumun bir arada olması şiddetli oligoastenoteratospermi (OAT) olarak adlandırılır. Genetik dizi tek başına gen ifadesinin veya hücresel fonksiyonun tamamını temsil etmez. DNA metilasyonu dahil epigenetik mekanizmalar, DNA dizisini değiştirmeden gen aktivitesini etkileyebilir. Yapılmış olan son yapılan çalışmalar epigenetik mekanizmalarda meydana gelen bozuklukların infertilite ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmaktadır (2,3,4). Epigenetik sperm DNA metilasyon ortamını etkilediği için oositin uygun şekilde döllenmesini bu sayede büyük ölçüde embriyonik gelişimi etkiler. Sperm maturasyon süresince epigenetik olarak birçok değişime uğrar. Spermatozenez sırasında, histonların bir kısmı çıkartılır ve oldukça kompakt nükleoprotamin kompleksleri oluşturan pozitif yüklü protaminler tarafından yoğunlaştırılır. Protaminasyon, sperm hücrelerine özgü epigenetik düzenlenmedir (5).

Maturasyon sürecinde olan histon post-translasyonel modifikasyonlar da olmak üzere kromatinin yeniden yapılanmasının, sperm kalitesini ve verimliliğini etkileyebileceği bilinmektedir ve bu nedenle sperm klinik değerlendirmeleri için epigenetik işaretlerin yararlı olabileceği düşünülmüştür. Bunun içinde belirlenen 3 hedef genin (*TBL1XR1*, *SPATA5* ve *SPATA7*) araştırılması hedeflenmiştir. Belirlen bu genlerden *SPATA* gen ailesinde bulunan *SPATA 5* ve *SPATA7* geni akrozom oluşumunda, mitokondriyal fonksiyonun sürdürülmesinde, sperm üretiminde, sperm motilitesinde, germ hücre gelişiminde, testis gelişiminde ve spermiyogenez sırasında sitoplazma hareketi ve çıkarılmasında rol oynar. Bu nedenle *SPATA* ailesi genlerin erkek fertilitesinde tartışmasız bir önemi vardır. *TBL1XR1* geni ise kromatinin yeniden şekillenmesi ve sperm farklılaşmasında görev alır. Farklı görevleri olan ve epigenetik değişimlerde rolleri olan genler seçilmiştir.

Bu çalışmada, ileri oligoastenoteratozoospermik örnekleri ile normozoospermik örnekler arasında DNA metilasyon farklılıkları açısından karşılaştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda Memorial Hastanesi IVF merkezine tedavi için başvuran 20 normospermik ve 20 ileri oligoaste-

noteratozoospermik olgudan semen örneği toplandı ve bu örnekler 2 yayma preparat olarak hazırlandı. Semen analizi değerlendirmesi WHO 2010 standartlarına göre yapılmıştır (6). İlk yayma preparat %37'lik formaldehit ile 30 dakika fikse edildi ve %5'lik anilin mavisi ile boyanmaya hazırlandı. İkinci hazırlanan yayma preparatlar Carnoy fiksativisi ile 30 dakika boyunca fikse edilip akrinin oranj boyamasına hazır hale getirildi. Formaldehit ile fikse edilen örnekler anilin blue boyası ile 7 dakika boyandı daha sonra distile su ile yıkandı ve kurutuldu. Ardından ışık mikroskopuyla 100x'lik objektif ile incelendi ve matur ve immatur sperm sayımı yapıldı. Carnoy fiksativisi ile fikse edilen örnekler hazırlanan akrinin oranj boyası ile 10 dakika bekletilerek boyandı ve distile su ile yıkayıp kurutuldu. 40x'lik objektif ile floresan mikroskopunda gözlemlendi ve gruplandırılması yapıldı.

Toplanan semen örneklerinden DNA izolasyonu için QIAGEN DNA Mini Kit kullanıldı. Semen örneklerine izolasyon işleminden bir gece öncesinde 5µl DTT, 20µl proteinaz K ve 200µl ATL tamponu eklenerek 56'da gece boyu inkübe edildi. Çalışma için belirlenen 3 gen için primer tasarımı yapılırken öncelikle Genom Browser programını kullanarak genin bulunduğu kromozom bölgesinde genin promoter bölgesi asetilasyon seviyeleri dikkate alınarak belirlendi. Metilasyona özel bir primer tasarlandığı için CGGC bölgelerine içine alan primerler tasarlandı. Elde edilen DNA örneklerindeki dizilerin bisülfid dönüşümü EZ DNA Metilasyon-Direkt kiti ile gerçekleştirildi. Bisülfid dönüşümünden elde edilen DNA'lar kalıp olarak kullanılarak PCR yapıldı. İlk olarak primerin hangi bağlanma sıcaklığında daha iyi bant verdiğini gözlemek için gradient PCR yapılarak 3 farklı sıcaklık ile denendi (52, 54 ve 56). Uygun bağlanma sıcaklığı seçilerek bisülfid dönüşümünün ardından seçilen hastalar için PCR yapıldı. Çalışmada yapılan tüm PCR'larda Thermo Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı.

20 normozoospermik, 20 ileri oligoastenoteratozoospermik örneği içeren 40 semen örneği içerisinde istenilen 300-400bç arasında bant gözlemlenen 2 normozoospermik, 2 ileri oligoastenoteratozoospermik örnek seçildi. Bu örnekler EZ DNA Metilasyon kiti kullanılarak bisülfid dönüşümü gerçekleştirildi ve aday genlerin primeri kullanılarak PCR işlemi yapıldı. Ardından örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Ve dizilemeye gönderilmek üzere jelden saflaştırılma işlemleri gerçekleştirildi.

İstatistiksel analizlerde SPSS 26 istatistik paketi kullanıla-

Tablo 1. Anilin blue boyaması T testi

	Grup 1 N=20	Grup 2 N=20	p
Matür	87,40±8,54	77,26±13,04	0,008*
İmmatür	12,60±8,54	22,74±13,04	0,008*

Grup1:Normospermik, Grup 2: Oligoastenoteratozoospermik *p<0,05 istatistiki anlamlılık

rak bağımsız değişkenlerde T testiyle karşılaştırıldı.

BULGULAR

20 normospermik ve 20 ileri oligoastenoteratozoospermik olgudan toplanan semen örneğinin maturasyon değerlendirilmesi için anilin blue boyaması yapıldı 100 sperm sayılıp matur ve immatur sperm oranı belirlendi. Ardından bu veriler SPSS 26 istatistik paketi kullanılarak bağımsız değişkenlerde T testiyle karşılaştırıldı (Tablo 1). Elde edilen

sonuçlara göre sperm maturasyonu ileri oligoastenoteratozoospermik olgularda düşük bulunmuştur.

Toplanan semen örneklerinin DNA fragmentasyon değerlendirmesi için akrinin oranj boyası kullanıldı ve 100 sperm sayılıp fragmentli DNA ve fragmentli olmayan DNA'ya sahip olan spermelerin oranları belirlendi. Ardından bu veriler karşılaştırılmıştır (Tablo 2). Elde edilen sonuçlara göre DNA fragmentasyonda iki grup arasında fark bulunamamıştır.

Tablo 2. Akridin oranj boyaması T testi

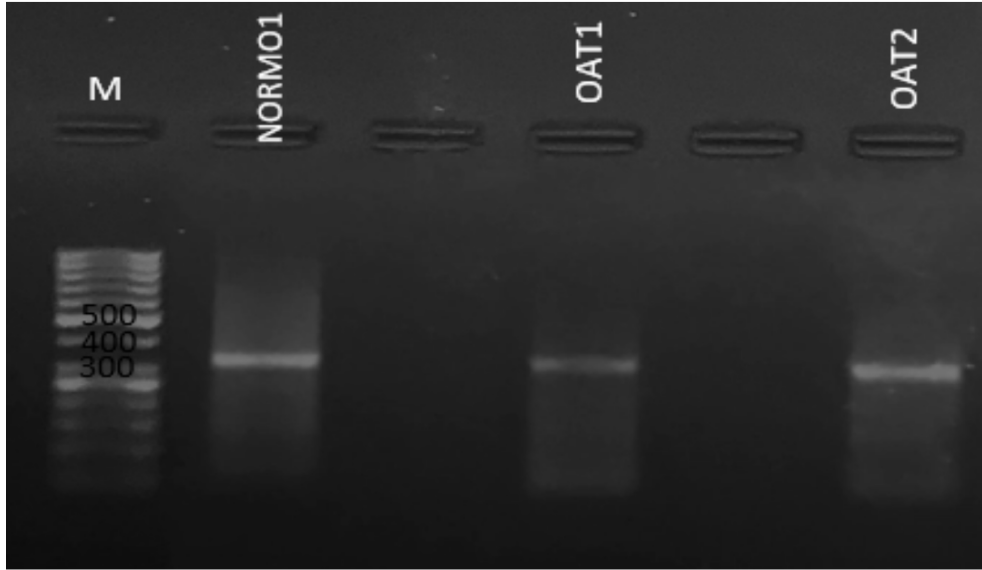
	Grup 1 N=20	Grup 2 N=20	p
Yeşil (%) Normal DNA	90,25±10,06	87,20±11,81	0,385
Kırmızı (%) fragmente DNA	9,75±10,06	12,80±11,81	0,385

Grup1:Normospermik, Grup 2: Oligoastenoteratozoospermik *p<0,05 istatistiki anlamlılık

DNA izolasyonunun ardından seçilen belirli örneklerle bisülfid dönüşümü yapıldı. Bisülfid dönüşümü yapılan DNA'larda metillenmiş sitozinler değişime uğramazken metillenmemiş sitozinler dönüşüm sonrasında urasile deamine olurlar. Ve yapılan PCR amplifikasyonun ardından urasile deamine olmuş sitozinler timine dönüşürler. Ve PCR işlemlerinin ardından yapılacak dizileme işlemi ile bu değişimi yorumlayabiliriz.

TBL1XR1, *SPATA5* ve *SPATA7* genleri için EZ DNA Metilasyon-Direkt kitinde istenilen uygun boyutlarda tasarlanan primerlerin optimizasyonlarının ardından 300-400bp arasında bant gözlemlenmesi gerekirken yapılan görüntüleme sonucunda istenilen bantlar gözlenemedi. *SPATA7* geninin primerleri tekrardan tasarlandı ve yeni primerlerde hem OAT hemde normo örnekte istenilen 300-400bp arasında bant verildiği gözlemlendi. (Şekil 1).

ŞEKİL 1. PCR sonuçları
M:50bp ladder(Thermo GeneRuler)



Bu sebeple çalışmaya en iyi bant veren gen ile devam edilme kararı alındı. Çalışma için belirlenen aday gen olan *SPATA7* geni için tasarlanan primerle ve bisüfit dönüşümü yapılmış DNA kalıbı kullanılarak 4 örneğe yapılan PCR sonucunda istenilen bant profili 3 örnekte gözlemlendi. Sekanslama sonucunda çalışılabilen az sayıda normospermik kontrol örnekleri ve oligoastenoteratospermik örneklerde belirlenen kısımlarında nükleotid farkı bulunmadığından metilasyonu etkileyecek bir fark belirlenmemiştir.

TARTIŞMA

Oligoastenoteratozoospermi(OAT) olguları hormonal veya testiküler fonksiyon bozuklukları ile ortaya çıkarlar ve OAT grubunda sperm DNA fragmantasyonu ve matürasyon kusurları yüksektir. Fakat erkek faktörlü infertilitenin moleküler temeli tam olarak anlaşılammıştır (7).

Bu çalışmada sperm protaminasyonu ile epigenetik mekanizmaların ilişkisi ve sperm DNA fragmantasyonu mekanizmalarında epigenetiğin rolünün araştırılması konusu ele alındı. Çalışmanın sonucunda belirlenen genler için tasarlanan primerlerle bisüfit dönüşümü gerçekleştirilen örneklerde *TBL1XR1* ve *SPATA5* genlerinde istenilen bant profillerine ulaşılamadı. *SPATA7* uygun

büyükte bant görüldü fakat sekanslama sonucunda anlamlı metilasyon farklılığı belirlenmedi.

Denomme ve ark'nın yaptığı çalışmada OAT grubunda seçilen farklı iki gende bisüfit dönüşümü yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada DNA metilasyonu bakılmadan global metilasyon ve probla işaretleme yöntemleri kullanılarak blastokist üzerine metilasyon etkisine bakılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. OAT olgularındaki epigenetik değişimlerin blastokist üzerine etkilerinin olduğu vurgulanmıştır (7).

Friemel ve ark'nın yaptığı çalışmada periferik kan örneklerinde *PIWIL1* ve *PIWIL2* genlerinde DNA metilasyonuna bisüfit dönüşümü metoduyla SNP farklılıkları araştırılmıştır. İnfertil örnekler ile sağlıklı hasta örnekleri arasında DNA metilasyon farklılıklarının küçümsenmeyecek kadar fazla olduğu fakat daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (8). Bizim sonuçlarımıza bakıldığında metilasyon farklılıklarının bulunmamasının sebebi sperm kalite farklılığı ve primer uyumsuzluğundan kaynaklanıyor olabilir. OAT örneklerinde yapılan polimeraz zincir reaksiyonlarında bantlarda kırıklar elde etmiş olmamızın sebebi OAT olgularında spermlerin fragmentli DNA'ya sahip olmasından dolayı olabileceğini düşündürmektedir. Diğer

bir Benchaib ve ark.'nın yaptığı çalışmadaki amaç semen parametrelerinin değerlendirilmesinde epigenetik bir bakış açısı sağlamaktır. Bu çalışmada farklı bir yaklaşımla immunositokimyasal yöntem ile metilasyon farklılıkları incelenmiş, flow sitometri ile farklılıklar doğrulanmıştır (9). Çalışmanın sonucu olarak ne dölleme oranı ne de kaliteli embriyoların oranı DNA metilasyon düzeyi ile ilişkisi bulunamamıştır.

Yapılmış olan ve yaptığımız çalışmada farklı genler ve metotlar kullanılarak metilasyonun infertilite üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar yapılacak olan diğer çalışmalara kaynak teşkil edecektir.

SONUÇ

Az sayıda bant elde edilen normospermik ve ileri oligoastenoteratozoospermik örneklerinde gerçekleştirilen tek yönlü okuma sonucunda anlamlı dizilime sahip olan kısımlarında nükleotid farkı bulunmadığından metilasyonu etkileyecek bir fark belirlenmemiştir. Aranılan fark hedeflenen bölge dışında seçilen bir dizi olabileceğinden daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

2019 / 2 dönemi ve 1919B011904082 başvuru numaralı proje TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir.

Received Date/Geliş Tarihi: 29.06.2021

Accepted Date/Kabul Tarihi: 06.09.2021

Kaynaklar

1. Boissonnas, C., Jouannet C.2013.Epigenetic Disorders and Male Subfertility. *Fertility and Sterility*; 99(3), 624–631.
2. Gannon, J. R., Emery, B. R.2013. The Sperm Epigenome: Implications for the Embryo.53–66. Springer.791
3. Jenkins TG, Carrell DT. The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. *Reproduction* 2012;143:727–34.
4. l Hajj N, Zechner U, Schneider E, Tresch A, Gromoll J, Hahn T, et al. Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males. *Sex Dev* 2011;5:60–9.
5. Gunes, S., & Kulac, T.2014.The role of epigenetics in spermatogenesis. *Türk Üroloji Dergisi/Turkish Journal of Urology*, 39(3), 181–187.
6. WHO Laboratuvar El Kitabı, İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi, (Çeviri Editörü:Kadioğlu Ateş) ,Nobel Tıp Kitabevleri,5.Baskı,İstanbul
7. Denomme, M. M., McCallie, B. R.2018. Inheritance of epigenetic dysregulation from male factor infertility has a direct impact on reproductive potential. *Fertility and Sterility*, 110(3), 419–428.e1.
8. Friemel,C.Ammerpohl,O.2014. Array-based DNA methylation profiling in male infertility reveals allele-specific DNA methylation in PIWIL1 and PIWIL2. *Fertility and Sterility*,P1097-1103.E1
9. Benchaib,M.Braun V.2005. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Human Reproduction*.Vol.20, No.3 pp.768–773.