

## İnfertilite ve Anormal Semen Analizleri Gösteren Erkeklerde FSHR Ala189Val Gen Polimorfizminin Analizi

Ebru ETEM<sup>a1</sup>, Faruk KUYUCU<sup>2</sup>, Arslan ARDIÇOĞLU<sup>2</sup>, Hüseyin YÜCE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

### ÖZET

**Amaç:** Follikül stimüle edici hormon (FSH) hormonu dişilerde follikulogenezis ve erkeklerde spermatogenezisde temel rol oynamaktadır. Erkeklerde FSH yetişkinlerde spermatogenezisin pubertal başlamasında ve kantitatif olarak normal sperm üretiminin korunmasında görevlidir. Follikül stimüle edici hormon reseptör (FSHR) geninde aktivasyon ve inaktivasyon mutasyonları tanımlanmıştır. 566C→T mutasyonu reseptör molekülünün ekstrasellüler alanını kodlayan bölgede olup FSHR geninin ekzon 7'sinde lokalizedir. Fonksiyonel testler mutasyonlu reseptör tarafından ligand bağlanması ve sinyal iletiminin azaldığını göstermektedir. Çalışmanın amacı Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre, aynı laboratuvar teknisyeni tarafından spermogram tetkikleri değerlendirilen 80 oligospermik hastada FSHR genindeki Ala189Val mutasyonunu incelemektir.

**Gereç ve Yöntem:** FSHR geninin ekzon 7'sindeki Ala189Val mutasyonu Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm (RFLP) yöntemi kullanılarak analiz edildi.

**Bulgular:** Homozigot veya heterozigot mutasyonlar tanımlanamamıştır.

**Sonuç:** Değerlendirilen hastaların sayısı küçük olmasına rağmen Fin populasyonu dışında tüm diğer populasyon raporları göz önünde bulundurulduğunda bu gendeki Ala189Val mutasyonunun sıklığı oldukça düşüktür. FSHR'deki Ala189Val mutasyonu oligospermili infertil Türk erkeklerde yaygın değildir. Bu sonuçlar FSHR genindeki C566T mutasyonunun Finlandiya'da yaygın ancak diğer populasyonlarda yaygın olmadığını desteklemektedir. ©2006, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

**Anahtar kelimeler:** FSHR, polimorfizm, infertilite, oligospermi

### ABSTRACT

#### FSHR Ala189Val Gene Polymorphisms in Men Presenting with Infertility and Abnormal Semen Analysis

**Objective:** The follicle-stimulating hormone (FSH) is considered essential for folliculogenesis in the female and spermatogenesis in the male. In the male, FSH is generally considered essential for the pubertal initiation of spermatogenesis and maintenance of quantitatively normal sperm production in adults. Mutations of the the follicle stimulating hormone receptor (FSHR) leading to either constitutive activation or inactivation of the receptor have been identified. The 566C→T mutation, predicting an alanine to valine substitution, is located in exon 7 of the FSHR gene, in the region encoding the extracellular domain of the receptor molecule. Functional testing showed a clear-cut reduction in ligand binding and signal transduction by the mutated receptor. The purpose of the present study was to investigate in 80 patients with oligospermia which spermograms were performed according to World Health Organization (WHO) guidelines by the same biologist to presented Ala189Val mutation in the FSHR gene.

**Materials and Methods:** Ala189Val mutation in the exon7 of the FSHR gene analyzed by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method.

**Results:** No heterozygous or homozygous mutant alleles were present in any of the patients.

**Conclusion:** Although the number of patients evaluated was small, considering all other previous reports, it seems that except in the Finnish population, proportion of men with Ala189Val mutation in this gene is very low. The Ala189Val mutation of FSHR is not a common polymorphism in Turkish infertile men with oligospermia. These results suggest that the C566T mutation of the FSHR gene is enriched Finland, but is uncommon in other population. ©2006, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

**Key words:** FSHR, polymorphism, Infertility, oligospermia

Gametlerin üretimi gonadlar üzerine etki eden lüteinizan hormon (LH) ve Follikül stimüle edici hormon (FSH)'unun hormonlarının etkisi altında gerçekleşmektedir. Postnatal mitotik ve mayotik germ hücre gelişimi sadece LH tarafından kontrol edilebilmesine rağmen tam Sertoli hücre proliferasyonu LH'ya gereksinim olmaksızın FSH tarafından başarılabilmektedir (2).

Erkeklerde FSH hormonu Sertoli hücre sayısının belirlenmesinde ve normal kantitatif ve kalitatif spermatogenezisin gerçekleşmesinde görev almaktadır. FSH,

G protein bağlı reseptör ailesinin bir üyesi olan reseptörüne bağlanarak çalışmaktadır (3). Follikül stimüle edici hormon reseptörü (FSHR) Sertoli hücrelerinde ve çevresindeki germinal hücrelerde vardır (4). FSHR geninde aktivasyon ve inaktivasyon mutasyonları tanımlanmıştır (5). Fonksiyonel testler mutasyonlu reseptör tarafından ligand bağlanması ve sinyal iletiminin azaldığını göstermektedir. FSHR'deki homozigot inaktivasyon mutasyonlarına sahip erkeklerde testiküler volüm azalmış, serum FSH konsantrasyonları artmış ve spermatogenezisde çeşitli düzeylerde hasar oluşmuştur. Erkek gonodal fonksiyonu için FSH'nın kritik önemi, FSH B

<sup>a</sup> Yazışma Adresi: Dr. Ebru Etem, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, ELAZIĞ  
Tel: 0 424 2370000/4614 e-mail: etemsare@hotmail.com

subunitinde bir mutasyona sahip infertil bir erkeğin tanımlanmasıyla ortaya konmuştur. Bu bulgular FSH reseptöründeki mutasyonların erkek infertilitesinde patojenik bir rol oynayabileceğini göstermektedir (3). 566C→T mutasyonu reseptör molekülünün ekstrasellüler alanını kodlayan bölgede olup FSHR geninin ekzon 7'sinde lokalizedir. Ala189Val mutasyonu özellikle erkek üremesinde olmak üzere FSH'nin etkisini anlamlı olarak değiştirmektedir (5). İn vivo deneyler bu mutasyonun FSH etkisinin tam bir inhibisyonuna neden olduğunu göstermiştir (3). Bu mutasyona sahip olan bireylerde maskulinizasyon normal olarak değerlendirilmiş ve önemsiz derecede testiküler volümde azalma gözlenmiştir. Farelerde yapılan deneylerde FSH reseptörüne sahip olmayan erkeklerde düşük testiküler volüm ve ağırlıkla beraber sperm miktarı ve kalitesinde düşüş mevcuttur (6). Ala189Val mutasyonu Finlandiya toplumunda yüksek sıklığa sahip olmasına karşın Finlandiya dışında primer amenoreli bir hastada bildirilmiştir (7). Finlandiya dışında bu mutasyonun sıklığı hem primer amenoreli hemde infertil oligospermik erkeklerde bilinmemektedir. Literatürde Türk popülasyonunda bu konuda yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmada Türk infertil oligospermik erkek hastalar da Ala189Val mutasyonunun varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre, aynı laboratuvar teknisyeni tarafından spermogram tetkikleri değerlendirilen 80 hasta alındı. Kontrol grubu olarak DSÖ kriterlerine göre normal sperm parametrelerine sahip 60 hasta kullanıldı (1). Hasta ve kontrol gruplarına hasta onay formu imzalatıldı. DNA izolasyonu için periferik kan kullanıldı. Genomik DNA izolasyonu Promega Wizard Genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı. FSHR genindeki Ala189Val polimorfizmi Kohek ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı. Kısaca, Ekzon 7'deki Ala189Val inaktivasyon mutasyonunun belirlenmesi için forward 5'-GGCCTTTTATTT-CAGATGG-CTG-3' ve revers 5'-TGGCCTTGAAG-AATAGTCAGG-3' primerleri kullanıldı. PZR sonunda 114bp'lik ürün oluşmaktadır. BsmI enzimi kesim sonrası ürünler %4'lük agoroz jele yüklendi. Val varlığında 56bp ve 58bp'lik ürünler oluşmaktadır. Heterozigot bireylerde 3 bant görülmektedir (8).

## BULGULAR

Çalışmaya alınan hastaların yaşları en küçük 21, en büyük 43 olmak üzere ortalama 32±11 ve kontrol grubunun yaş ortalaması en küçük 25, en büyük 35 olmak üzere 30±5'dir. Tüm hasta ve kontrollere PZR başarı ile uygulanmıştır. Çalışmada hasta ya da kontrol grubunda Ala189Val polimorfizmi tespit edilememiştir. Resim 1'de Ala189Val polimorfizmi için agoroz jel elektroforez sonuçları verilmiştir.

## TARTIŞMA

Çalışma Türk popülasyonunda Ala189Val mutasyonunun infertil oligospermik hastalarda tarandığı ilk çalışmadır. Oligospermik erkeklerde ve infertil kontrolde herhangi bir homozigot yada heterozigot mutasyona rastlanmamıştır.

FSH testisinde Sertoli hücre fonksiyonunu ve ovaryumda granuloza hücrelerinde estrogen üretimini ve follüküler maturasyonu indüklemektedir. FSH reseptör genindeki Ala189Val mutasyonu resesif olarak kalıtılan inaktive edici bir nokta mutasyonudur. Mutasyon ekzon7'nin 566 pozisyonunda

C→T transisyonu meydana getirerek reseptör molekülünün ekstrasellüler alanındaki 189 alanin amino asidinin valine substitüsyonuna neden olmaktadır. Transfekte myeloid suppressor hücrelerde Ala189Val reseptör mutasyonunun in vitro fonksiyonel testleri sinyal iletiminin tam inhibisyonu ve azalmış bağlanma kapasitesini göstermektedir. Vaskivuo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 22 kadın ve 5 erkek bireyde Ala189Val heterozigot mutasyonu tespit etmişlerdir. Bu mutasyon açısından homozigot erkeklerde sperm üretiminin olduğunu belirtmişlerdir. Ancak 5 erkekten 2'sinde oligostenospermi tespit edilmiştir (3). Gromoll ve arkadaşları hipofizektomi yapılan hipogonadotropik erkeklerde yaptıkları çalışmada FSH reseptörünün aktivasyon mutasyonunun uygun olmayan testis büyüklüğüne sahip vakaların temelini oluşturabileceğini belirtmişlerdir (9).



**Şekil1.** İnsan FSHR genindeki wild type Ala189Val allelinin tespiti. **Sütun1:** 100 bp'lik DNA boyut markırı. **Sütun 2-3:** bir wild type bireyie ait PZR ürünü.

Chesnaye ve arkadaşları 9 saf gonadal disgenezisli Meksikalı hastada yaptıkları çalışmada bu mutasyona rastlanmamışlar ve mutasyonun Fin popülasyonuna özgü olabileceğini belirtmişlerdir (10). Layman ve arkadaşları prematüre ovarian yetmezliği olan 35 hastada yaptıkları çalışmada bu mutasyonu tespit edememişlerdir (6).

Popülasyon düzeyinde sonuçlar Finlandiya'da bu mutasyonun frekansının %0.96 olduğunu göstermesine rağmen diğer popülasyonlarda sıklığı ya çok düşük düzeyde bulunmuş yada hiç tespit edilememiştir. Bu sonuç Finlandiya'da diğer hastalıklara neden olan genlerin yüksek sıklığı ile tutarlılık göstermektedir. Finlandiya'da diğer yerlerde olmayan yaklaşık 30 kalıtsal hastalık tanımlanmıştır. Bu özellik izole bölgelerde çoğalan bir popülasyonda genetik drift ile atasal etkilerin bir kombinasyonu sonucu oluşmaktadır (11).

Sonuç olarak, popülasyon spesifik polimorfizmlerin ortaya konması için belirli bir popülasyonda ilk defa belirlenen bir polimorfizm diğer popülasyonlarda da çalışılması gerekmektedir. Polimorfizimler bazen belirli bir bölgeye spesifik olabilmekte ve frekanslarını o bölgede atasal olarak arttırabilmektedirler. FSHR genindeki Ala189Val polimorfizminin bölgesel frekansını bu tür bir atasal kalıtımla arttırdığı muhtemeldir. Türk popülasyonunda ve diğer popülasyonlarda genin tam mutasyon analizleriyle genin aktivasyon veya inaktivasyonuna neden olan FSHR mutasyonlarının bulunması muhtemeldir.

**KAYNAKLAR**

1. World Health Organization: WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm- Cervical Mucus Interaction. Cambridge, England, Cambridge University Pres, 1999.
2. Allan CM, Garcia A, Spaliviero J. Complete Sertoli cell proliferation induced by follicle-stimulating hormone (FSH) independently of luteinizing hormone activity: evidence from genetic models of isolated FSH action. *Endocrinology* 2004; 4: 1587-1593.
3. Vaskivuo TE, Aittomaki K, Anttonen M. Effects of follicle-stimulating hormone (FSH) and human chorionic gonadotropin in individuals with an inactivating mutation of the FSH receptor. *Fertil Steril* 2002; 78: 108-113.
4. Baccetti B, Collodel G, Costantino-Ceccarini E. Localization of human follicle-stimulating hormone in the testis. *FASEB J* 1998; 2: 1045-1054.
5. Tapanainen JS, Aittomaki K, Min J, Vaskivuo T, Huhtaniemi IT. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet* 1997; 2: 205-206.
6. Layman LC, Amde S, Cohen DP, Jin M, Xie J. The Finnish follicle-stimulating hormone receptor gene mutation is rare in North American women with 46,XX ovarian failure. *Fertil Steril* 1998; 2: 300-302.
7. Allen LA, Achermann JC, Pakarinen P. A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotrophic hypogonadism: clinical and molecular characteristics. *Hum Reprod* 2003; 2: 251-256.
8. Kohek MB, Batista MC, Russell AJ. No Evidence of the inactivating mutation (C566T) in the follicle-stimulating hormone receptor gene in Brazilian women with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 1998; 70: 565-567.
9. Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. An activating mutation of the follicle-stimulating hormone receptor autonomously sustains spermatogenesis in a hypophysectomized man. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1367-1370.
10. de la Chesnaye E, Canto P, Ulloa-Aguirre A, Mendez JP. No evidence of mutations in the follicle-stimulating hormone receptor gene in Mexican women with 46,XX pure gonadal dysgenesis. *Am J Med Genet* 2001; 2: 125-128.
11. Jiang M, Aittomaki K, Nilsson C, Huhtaniemi I. The frequency of an inactivating point mutation (566C→T) of the human follicle-stimulating hormone receptor gene in four populations using allele-specific hybridization and time-resolved fluorometry. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 12: 4338-4343.

*Kabul Tarihi: 16.02.2006*