T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Emine İkbal ATLI

NON-OBSTRÜKTİF AZOSPERMİK (NOA) İNFERTİL HASTALARDA YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ (NGS) İLE GENETİK ETİYOLOJİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Cansu AYDIN

Referas no: 10396160

EDİRNE – 2022

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Emine İkbal ATLI

NON-OBSTRÜKTİF AZOSPERMİK (NOA) İNFERTİL HASTALARDA YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ (NGS) İLE GENETİK ETİYOLOJİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Cansu AYDIN

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2021/114

Tez No:

EDİRNE – 2022

TEŞEKKÜRLER

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimim boyunca akademik bilgi ve tecrübesiyle bana her zaman emek veren ve destekleyen danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Emine İkbal ATLI ve akademik hayatımın oluşumunda emeğini ve desteğini esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. Rasime KALKAN başta olmak üzere tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma, çalışmamızı proje olarak destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (TÜBAP 2021/114) teşekkür ederim.

İTHAF

Sevgisinin ve varlığının her zaman benim ile olduğunu hissettiğim rahmetli Dedem'e ve her zaman yanımda olan Annem'e ve Babam'a

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

ERKEK ÜREME SİSTEMİ 3

SPERMATOGENEZİS 5

İNFERTİLİTE 6

ERKEK İNFERTİLİTESİ 7

NON-OBSTRÜKTİF AZOSPERMİ (NOA) 9

NOA İLE İLİŞKİLİ OLAN VEYA OLABİLME İHTİMALİ YÜKSEK OLAN GENLER 11

YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ (NGS) 18

GEREÇ VE YÖNTEMLER 21

BULGULAR 39

TARTIŞMA 50

SONUÇLAR 63

ÖZET 64

SUMMARY 66

KAYNAKLAR 68

ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ 83

ÖZGEÇMİŞ 86

SİMGE VE KISALTMALAR

ACMG-2015 **:** American College of Medical Genetics and Genomics-2015

AR **:** Autosomal Recessive

CADD **:** Combined Annotation Dependent Depletion

CATSPER1 **:** Cation Channel, Sperm-Associated, 1

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

CFTR **:** Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

dbSNP **:** Single Nucleotide Polymorphism Database

DDX25 **:** Dead-Box Helicase 25

DM **:** Disease-causing Mutation

DNA **:** Deoxyribo Nucleic Acid / Deoksiribo Nükleik Asit

DNAH1 **:** Dynein Axonemal Heavy Chain 1

DNAH17 **:** Dynein Axonemal Heavy Chain 17

DNAH6 **:** Dynein Axonemal Heavy Chain 6

DPY19L2 **:** Dpy-19 Like 2

FKBPL **:** FK506-Binding Protein-Like

gDNA **:** genomic DNA / genomik DNA

GRTH **:** Gonadotropin-Regulated Testicular RNA Helicase

HGMD **:** Human Genom Mutation Database

IGV **:** Integrative Genomics Viewer

KF **:** Kistik fibroz

KLHL10 **:** Kelch-Like 10

LHB	**:** Luteinizing Hormone, Beta Polypeptide
MAJIN	**:** Membrane-Anchored Junction Protein
MEI1	**:** Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein 1
MMAF	**:** Multiple Morphological Abnormalities of the sperm Flagella
MTRR	**:** 5-Methyltetrahydrofolate-Homocysteine Methyltransferase Reductase
NGS	**:** Next Generation Sequencing / Yeni Nesil Dizi Analizi
NOA	**:** Non-Obstrüktif Azospermi
NPHP4	**:** Nephrocystin 4
PCR	**:** Polymerase Chain Reaction
PIWIL1	**:** Piwi Like RNA-Mediated Gene Silencing 1
PolyPhen	**:** Polymorphism Phenotyping v2
SHIFT	**:** Sorting Intolerant From Tolerant
SIRPA	**:** Signal Regulatory Protein Alpha
SIRPG	**:** Signal Regulatory Protein Gamma
SOX10	**:** SRY-Box Transcription Factor 10
SRY	**:** Sex-determining Region Y protein
TERB1	**:** Telomere repeats-binding bouquet formation protein 1
VUS	**:** Variant of Uncertain Significance
ZMYND15	**:** Zinc Finger MYND-Type Containing 15

GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite diğer adı ile kısırlık, klinik olarak en az 12 ay düzenli korunmasız cinsel ilişki durumundan sonra gebelik elde edilememesi olarak tanımlanan hem kadınlarda hem de erkeklerde görülen bir üreme sistemi hastalığıdır. Dünya çapındaki çiftlerin yaklaşık %10-15'inde görülmektedir. İnfertil çiftlerin de yaklaşık olarak yarısında erkek infertilitesi görülmektedir. (1, 2).

Olabilecek nedenler arasında ejekülatta spermatazoanın (sperm) önemli ölçüde azalması veya yokluğu ile karakterize olan şiddetli oligozoospermi ve azospermi yaygın olarak bildirilmiştir. Azospermi ise 2 alt grupta karşımıza çıkmaktadır: obstrüktif azospermi (OA) ve non-obstrüktif azospermi (NOA). NOA, kantitatif spermatojenik bozukluğun ekstrem bir formudur. Bozulan spermatogenez nedeni ile semende saptanabilir spermatozoa eksikliğine neden olur ve infertil erkeklerin yaklaşık %10-15'inde görülmektedir (3).

NOA genetik ve klinik olarak heterojen bir durumdur. NOA'nın genetik temellerini anlamak bu ilişkili durumun risk faktörlerini belirlemede önemli bir ilk adımdır. Bundan dolayı NOA'nın klinik olarak ilgili nedenlerinin belirlenmesi, genetik danışmanlık da dahil olmak üzere hastalara uygun danışmanlık ve tedavinin sağlanması açısından kritik öneme sahiptir.

Çalışmamızda NOA tanısı alan 40 hastada, yeni nesil dizi analizi (NGS) yöntemi ile genetik etiyolojinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda literatürde NOA ile ilişkili olan veya olabilme ihtimali yüksek olan 21 geni, *TERB1* (Telomere repeats-binding bouquet formation protein 1), *MAJIN* (Membrane-anchored junction protein), *MTRR* (5-Methyltetrahydrofolate-Homocysteine Methyltransferase Reductase), *PIWIL1* (Piwi Like RNA-Mediated Gene Silencing 1), *SOX10* (SRY-Box Transcription Factor 10), *SIRPG* (Signal Regulatory Protein Gamma), *SIRPA* (Signal Regulatory Protein Alpha), *DNAH6* (Dynein

Axonemal Heavy Chain 6), *MEI1* (Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein 1), *DNAH17* (Dynein Axonemal Heavy Chain 17), *ZMYND15* (Zinc Finger MYND Domain-Containing Protein 15), *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), *DNAH1* (Dynein Axonemal Heavy Chain 1), *DPY19L2* (Dpy-19 Like 2), *SEPTIN12* (*SEPT12*), *KLHL10* (Kelch-Like 10), *DDX25* (Dead-Box Helicase 25), *LHB* (Luteinizing Hormone, Beta Polypeptide), *CATSPER1* (Cation Channel, Sperm-Associated, 1), *NPHP4* (Nephrocystin 4) ve *FKBPL* (FK506-Binding Protein-Like), içeren NGS yöntemi tabanlı hedefli gen paneli tasarlanarak NOA'nın genetik etiyoloji araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

ERKEK ÜREME SİSTEMİ

Bir erkeğin üreme ve idrar sistemini oluşturan birçok organı içeren sisteme erkek üreme sistemi denir. Bu sistem vücuttaki sıvı atık olan idrarı uzaklaştırmadan ve spermatozoa, testosteron ve seminal plazma üretiminden sorumludur. Erkek üreme sistemi organları vücudun dışında (dış genital organlar) ve içinde (iç genital organlar) lokalize olmak üzere 2 bölümden oluşur (4).

Dış Genital Organlar

1-Penis: Kavernoz doku yapısından oluşan çiftleşme organıdır. 2 bölümden oluşur: penisin gövdesi olarak bilinen korpus penis ve penisin kökü olarak bilinen radiks penis. Korpus penis, penisin ucundan pubise kadar uzanan bölümdür. Radiks penis preniumda bulunan kök bölümüdür.

2-Skrotum: Torba şeklinde bir yapısı olan ve epididim, testis ve funikulus spermatikus'un bir kısmını içeren bölümdür.

İç Genital Organ

1-Testis: Primer üreme organı olarak adlandırılan testis, karın boşluğunun dışında funikulus spermatikus'a asılı skrotum içinde bulunan bölümdür. Sperm ve testosteron hormonu üretimi yapılmaktadır. Testis içinde sertoli hücreleri yer almaktadır. Bu hücreler:

-Gelişim aşamasında olan sperm hücrelerini besler ve korur.

-Spermiyogenez aşamasında flagella çevresindeki fazla sitoplamayı fagositoz eder.

-Spermiyasyon aşamasındaki olgun spermatidlerin seminifer tübül lümenine salınımında yardım eder.

-Seminifer tübül lümenine protein ve iyon açısından zengince bir sıvı salgılar.

2-Epididim: Spermiyasyon sürecinden sonra gelişimini tamamlayan spermatozoaların depolandığı bölümdür. Ve aynı zamanda spermatozoaların prostat salgısı ile hareket etme yeteneği de burada kazanmaktadırlar. Yani hareket kazanarak ovumu dölleyebilme yetenekleri oluşur. Bu yeteneği kazanmalarına kapasitasyon adı verilir.

3-Funikulus spermatikus: Spermatozoonları taşıyan, vas deferans, testise giden atardamarları ve testisten çıkan toplardamarları, testise giden sinirleri içeren kordon benzeri bölümdür.

4-Vas deferans (ductus deferens): Olgun spermatozoaların büyük bir bölümünün depolandığı bölümdür. Olgun spermatozoalar epididim ve vas deferansta neredeyse 1 ay yaşayabilmektedirler. Bu sürenin geçmesi durumunda ise dejenere olarak vücut tarafından absorbe edilir.

5-Glandula vezikuloza (glandula seminalis): Tubüler yapıda bulunan bir çift bezdir. Bu bez çiftinin früktoz, sitrik asit, fibronejen, prostaglandin ve özel proteinlerce zengin salgısı ejekülatın en büyük bölümünü (~%60) oluşturmaktadır. Bu sıvı yardımıyla spermatozoaları aktifleştirir. Ayrıca hem uterusta kasılmalara neden olarak spermlerin ovuma ulaşmasını sağlar hem de kadın genital traktusunda immünosüpresif bir etki yaratması fertilizasyon aşamasında önemlidir.

6.-Prostat (glandula prostatika): Ejekülatın %15-25'lik bir bölümünü oluşturur. Ovumun döllenmesi için bazik yapıya sahiptir.

7-Cowper bezleri (glandula bulbouretralis): Cowper bezleri müköz yapıda bir salgı salgılar. Siyalitik asit, galaktoz ve galaktozamin gibi bileşenler içermektedir. Bu salgı, seksüel uyarı sırasında ilk aktive olması ile semenin üretraya geçişini kolaylaştırır. Ayrıca üretra içinde kalmış olan idrarı nötralize eder.

8-Ejekülat (semen): Epididim, vas deferans, vesikula seminalis, prostat ve Cowber bezlerinde salgılanan salgılarla birlikte içinde spermleri bulunduran sıvıdır.

9-Duktus ejekulatorius: Vas deferansın üretra ile birleşmesinden sonra gelen bölümdür (4, 5).

SPERMATOGENEZİS

Spermatogenez, spermatogonial kök hücrelerden mitoz ve mayoz bölünme ile spermatozoanın üretildiği biyolojik bir süreçtir (5-11). Normal spermatogenez için gerekli olan sıcaklık aralığı 34-35°C 'dir (12). Spermatogenez ergenlikten önce gonadotropin seviyesinin artışı ile başlar ve ömür boyu devam eden bir süreçtir. Kompleks bir dizi süreci içerir. 3 farklı aşamada gerçekleşir (5-11).

Spermatogonial Faz

Testisin yapısında bulunan seminifer tübüllerinin duvarlarında bulunan spermatogonianın mitoz bölünme ile kendilerini değiştirdiği fazdır. Bu faz sonunda spermatogonia farklılaşarak daha kararlı olan birincil spermatosit yapısı oluşmaktadır. 3 tip spermatogonia vardır (5-11):

1-Soluk A tipi spermatogonia: Ergenlikle birlikte yüksek mitotik aktiviteye sahiptir. Seminifer epitelinin kök hücresi olduğu düşünülmektedir. Ya kendi devamlılığını sürdürmek için aynı tipte kalır ya da koyu A tipi spermatogoniaları oluşturmak için mitoz ile bölünürler.

2-Koyu A tipi spermatogonia: Mitotik olarak inaktif hücrelerdir. Tip B spermatogoniaları oluşturmak için mitoz ile bölünürler.

3-Tip B spermatogonia: Mitoz bölünme ile birincil spermatozoayı oluşturur.

Spermatosit Fazı (Mayoz Bölünme)

B tipi spermatogonianın mitoz ile bölünmesi sonunda birincil spermatositler oluşur. Oluşan birincil spermatositler bu aşamada mayoz bölünmeden önce deoksiribonükleik asitleri (DNA) kopyalarlar. Bu durum sonunda her bir birincil spermatosit 2n kromozom sayısına sahiptir ve DNA miktarlarını 2 katına (4d-iki kardeş kromatit) çıkarırlar.

Mayoz 1 sonucunda haploit kromozom sayısı (n) ve 2d DNA miktarına sahip olan ikincil spermatositler oluşur. 2. mayoz bölünmeden önce replikasyon gerçekleşmez. Mayoz 2'den sonra her bir ikincil spermatositler 1d DNA miktarına ve haploit (n) kromozom sayısına sahip olurlar (5-11).

Spermiyogenez (Spermatid Fazı)

Haploit spermatidler haploit olgun spermlere farklılaştığı fazdır. Bu faz dört kademede gerçekleşmektedir.

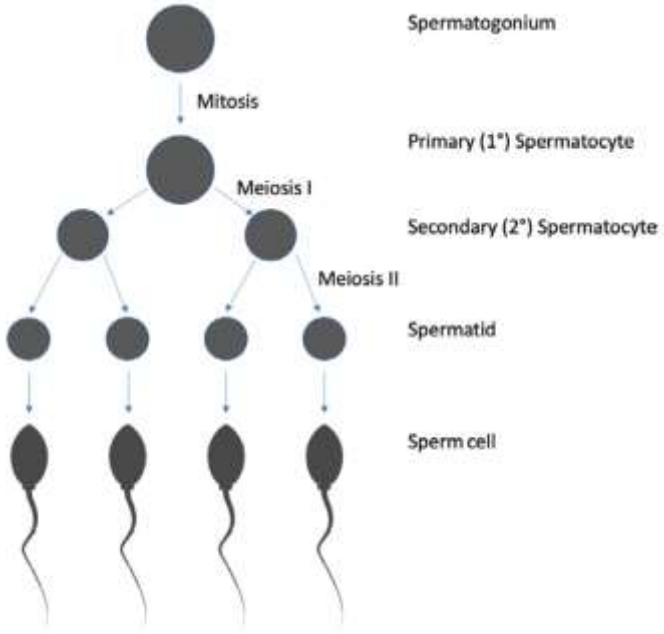
1-Golgi fazı: Spermatidde bulunan golgi gövdesinde akrozom enzimlerinin oluştuğu fazdır.

2-Kep fazı: Oluşan akrozomların kep oluşturmak için nükleus çevresinde yoğunlaştığı fazdır.

3-Akrozom fazı: Olgunlaşacak olan spermin kuyruğunu oluşturmak için sentriyolün uzadığı fazdır.

4-Olgunlaşma fazı: Flagella çevresindeki fazla sitoplazmanın sertoli hücreleri tarafından fagosite edilmesiyle olgun spermatozoonun oluştuğu fazdır.

Oluşan olgun spermatozoolar hareketsizdir. Seminifer tübüllerin lümenine salınması fazına da spermiasyon denir. Olgun spermatozoolar, epididimiste birkaç gün geçirerek hareketlilik kazanırlar ve fertilizasyon yeteneğine sahip olurlar (5-11) (Şekil 1.).



Şekil 1. Spermatogenezin genel aşamaları (9)

İNFERTİLİTE

İnfertilite Tanımı

İnfertilite diğer adı ile kısırlık, kompleks, heterojen ve multifaktöriyel patolojik bir durumdur. Klinik olarak en az 12 ay düzenli, korunmasız cinsel ilişki durumundan sonra gebelik elde edilememesi olarak tanımlanan üreme sistemi hastalığıdır. Hem kadınlarda hem de erkeklerde görülmektedir (13). İnfertilite 2 alt gruba ayrılmaktır (14-16):

1-Primer infertilite: Daha önce hiçbir gebelik öyküsünün tanımlanmadığı infertilite durumudur.

2-Sekonder infertilite: Daha önceden en az bir gebelik öyküsünün tanımlandığı infertilite durumudur.

İnfertilite Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 14 Eylül 2020 güncellemesine göre dünya çapında üreme çağında olan 48 milyon çift ile 186 milyon kişide infertilite durumu söz konusudur (15). Dünya çapında üreme çağında olan çiftlerin %8-12'si infertilite endikasyonuna sahip olduğu tahmin edilmektedir (14). Global olarak her 10 çiftten 1'i infertilite problemi yaşaması ile birlikte bu oranın yaklaşık %50'si erkek infertilitesi olarak karşımıza çıkmaktadır (8).

Primer ve sekonder infertilite görünme oranları sırasıyla %67-71 ve %29-33'tür. İnfertil erkeklerin yarısından fazlası idiyopatik yani nedeni bilinmemekte ve doğuştan veya sonradan edinilmiş olabilir. İnfertilite nedenlerinin %10'luk bir kısmı ise tıbbi olarak açıklanamamaktadır (16).

İnfertilite multifaktöriyel bir erkek ve kadın üreme sistemi hastalığıdır. Etiyolojisinde epigenetik, genetik ve genetik olmayan birçok faktör önemli bir role sahiptir.

ERKEK İNFERTİLİTESİ

Erkek infertilitesi karmaşık, heterojen ve multifaktöriyel bir patolojik durumdur. Genetik faktörler ise yaklaşık %15'inden sorumludur. Vakaların neredeyse %50'sinde erkek infertilitesi tek başına ya da kadın faktörleri ile kombine şekilde karşımıza çıkmaktadır.

Erkek İnfertilitesinin Genetik Etiyolojisi

Erkek infertilite vakalarının yaklaşık %10'u tıbbi olarak açıklanamamaktadır (16). Ama erkek infertilitesinin nedenleri arasında genetik ve genetik olmayan faktörler bulunmaktadır.

1-Kromozom anomalileri:

1.1-Sayısal kromozom anomalileri:

1.1.1-Klineferter sendromu (47,XXY): Erkek infertilitesinde en sık karşılaşılan kromozomal anomalilerden bir tanesidir. Prevelansı yaklaşık 1:500 ile 1:1000 arasında görülmektedir (4, 14, 17, 18). Bu sendroma sahip olan hastalarda genellikle spermatogenezde primer spermatosit oluşumunda duraklama gerçekleşir (19). Hastalar genellikle azospermi endikasyonu ile görülmektedir (14).

1.1.2-47,XYY sendromu (Jacobs sendromu): Prevelansı 1:750 olarak görülen bir anomalidir. YY sperm yapısının oluşumu paternal mayoz 2'deki ve postzigotik mitotik ayrılmama (nondisjunction) kaynaklıdır. Bu fenotipe sahip erkek hastalar fertil olmakla birlikte spermatogenezde olgunlaşma fazındaki duraklama sonucunda infertilite görülebilmektedir. Bu hastalar genellikle azospermik veya şiddetli oligozoospermik olabilmelerine rağmen normozoospermiye kadar farklılık gösterebilmektedir (17, 18).

1.1.3-45,X/46,XY mozaisizim: Miks gonodal disgenezi olarak da bilinmektedir. Embriyonik gelişimin erken dönemlerinde Y kromozomunun bir kısmının kaybı ile oluşmaktadır. Prevelansı yaklaşık olarak 1:20000 olan nadir bir sendromdur. Testis oluşumu normal olmasına rağmen genellikle kriptorşidizm görülmektedir. Canlı germ hücreleri bulunmamaktadır (14, 18). Bu karyotip, fenotipik olarak kadın (Turner sendromu) veya fenotipik olarak fertil erkek ve azospermik erkek olarak karşımıza çıkmaktadır. Ama bu karyotipe sahip hastaların çoğunlukla fenotip olarak erkek oldukları görülmüştür (20, 21).

1.2-Yapısal kromozom anomalileri:

1.2.1-Robertsonian translokasyonları: En yaygın görülen dengeli translokasyondur. Aynı zamanda erkek infertilitesinin en yaygın görülen nedenleri arasındadır. Translokasyona sahip kromozomların mayoz bölünmede homolog kromozom eşleşmesi sırasında trivalent yapı oluştururlar ve spermatogenezde translokasyonlu kromozomların ayrılması sırasında meydana gelecek hatalar fertilite oranının azalmasına neden olur. Sağlıklı erkeklere kıyasla infertil erkeklerde 9 kat daha sık rastlanmaktadır. Ciddi derecede spermatojenik disfonksiyonu olan infertil erkeklerin yaklaşık %0,9-3.4'ünde görülmektedir (13, 22-25).

1.2.2-Resiprokal translokasyonlar: Resiprokal translokasyonlar azospermik ve oligospermik erkek hastalarda görülmektedir. Bu translokasyonu taşıyan erkek hastalarda spermatogenezde mayoz bölünme aşamasında hata ve olgunlaşma fazında duraklamasına neden olur. Bunun sonucunda dengesiz gamet oluşumu görülür (22-26).

1.2.3-46,XX erkek sendromu: İnfertil erkek hastalarda nadir olarak görülen bir anomalidir. Prevelansı 1:20000 erkek yenidoğanda görülmektedir. X ve Y kromozomlarının kısa ve uzun kollarının distal bölgelerinde psödootozomal bölgeler bulunur. Bu bölgelerde X ve Y kromozomlarında benzerlik gösteren DNA dizileri bulunur. Testis belirleyici faktör (*SRY)* geni de Y kromozomunda kısa kolundaki bu psödootozomal bölgelere yakın yerdedir. Paternal mayoz bölünme esnasında bu bölgede rekombinasyon gerçekleşir. Rekombinasyon esnasında *SRY* genini içeren Y kromozom dizileri, X kromozomunun kısa koluna transloke olur ve Y kromozomunun uzun kolu üzerinde bulunan spermatogenezle ilişkili azospermik faktör (AZF) bölgeleri bulunmaz. Bu nedenden dolayı 46, XX karyotipine sahip erkek hastalar azospermik olarak karşımıza çıkmaktadır (27, 28).

1.2.4-İnversiyon: Spermatogenezde mayoz bölünmede homolog kromozomların eşleşmesi aşamasında delesyon ve duplikasyon oluşmasına sebep olur. Delesyon ve duplikasyon sonucunda spertmatid oluşumu duraklar ya da anöploid sperm hücreleri oluşturur. İnfertil erkek hastalarda en sık 1, 3, 4, 6, 9, 10 ve 21. kromozomlarda oluşan inversiyonlar görülür. Bu kro-

mozomlardaki inversiyon sonucunda sperm üretiminde bir azalma görülür. Bu azalma sonucunda infertiliteye neden olduğu bulunmuştur. Kromozom 9'da gerçekleşen inversiyonlar genellikle azospermi ile ilgili ve infertil hastalarda görülme sıklığı 9 kat daha fazladır (13, 29, 30).

1.2.5-Marker kromozom: Yapısal olarak anormal kromozomlardır. Kromozomlardan herhangi birine ait küçük kromozomal parçası olarak tanımlanırlar. En yaygın olan marker kromozom 46 kromozoma ek olarak bulunan supernumerary marker kromozomlardır (sSMC). sSMC, spermatogenezde hatalara ve oligospermiye neden olabileceği tahmin edilmektedir (31-33).

2-Y kromozom mikrodelesyonu: Y kromozomunda oluşan mikrodelesyonlar infertil erkek hastalarda sık rastlanmaktadır (13, 16, 17, 22, 28, 34). Özellikle azospermik (%13) ve oligozospermik (%3-7) hastalarda görülmektedir (16). Y kromozomu üzerinde lokalize olan AZF lokusu sperm gelişimi ve farklılaşmasından sorumludur. AZFa, AZFb ve AZFc lokuslarındaki mikrodelesyonlar sperm üretiminde hatalara neden olur. Azospermik infertil hastalarda sıklıkla görülmektedir (13, 17, 22, 28, 34-36).

3-Mitokondriyal DNA (mtDNA) anomalileri: Yuvarlak spermatidlerde hücre farklılaşması, sperm üretiminin miktarı ve kalitesi, testislerde gerçekleşen apoptoz ve olgun sperm hareketliliği ve döllenmesi için gerekli enerji mitokondriyal DNA (mtDNA) tarafından sağlanır. mtDNA'da gerçekleşebilecek hatalar spermatogenezde hatalara sebep olabilir ve erkeklerde infertilite ile sonuçlanabilmektedir (16, 37-41). Sperm mtDNA delesyonları azospermik infertil hastalarda tespit edilmiştir (42).

NON-OBSTRÜKTİF AZOSPERMİ (NOA)

Üreme çağındaki erkeklerde 1 mililitre (ml) semen içerisinde en az 15 milyon sperm bulunması gerekmektedir (43). Ama bazı durumlar sonucunda semende spermatazoa gözlenmeyebilir. Bu durum da azospermi olarak tanımlanmaktadır. Azospermik infertil erkek hastalar, infertil erkek hastaların %10-15'ini oluşturmaktadır. Bu oranda erkek popülasyonun yaklaşık %1'ini temsil etmektedir (44, 45).

Azospermi, OA ve NOA olarak 2 alt gruba ayrılmaktadır (13, 46-49). Azospermi etiyolojisine bağlı olarak pretestiküler, testiküler ve/veya posttestiküler olarak 3 ana katogoride görülebilir (50). OA ejekülat yolunun tıkanmasından kaynaklanırken (posttestiküler), NOA spermatogenezde oluşabilecek hatalar sonucundan kaynaklanmaktadır (pretestiküler veya testiküler) (Tablo 1) (13, 46).

Tablo 1. Azosperminin etiyolojisi

Pretestiküler	Testiküler	Posttestiküler
Endokrin bozuklukları • Doğuştan (Kallman sendromu) • Edinilmiş (Hipofiz bozuklukları) • İkincil (İlaçların yan etkisi) (50)	Spermatojenik bozukluklar • Konjenital (Anorşi, kriptorşidizm, genetik anomaliller (Y kromozomu delesyonları), Sertoli hücreli sendromu ve matürasyon arrest) • Edinsel (Travma, torsiyon, enfeksiyon (kabakulak), testis tümörleri, ilaçlar, cerrahi operasyonlar, siroz ve böbrek yetmezliği gibi sistemik hastalıklar ve varikosel • İdiyopatik (50)	Spermatozoanın testisten taşınmasındaki tıkanıklıklar • Doğuştan (Vas deferensin konjenital bilateral yokluğu (CBAVD)) • Sonradan kazanılmış (vazektomi, iyatronejenik yaralanma kaynaklı) • Spermatozoanın taşınmasını engelleyen ejekülatör bozukluklardan (50)

Ayrıca epigenetik faktörler olarak anormal DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu embriyogenezin normal akışını etkileyebilir ve azospermiye yol açabilir. Ama erkek infertilitesine neden olan histon modifikasyonları tam netlik kazanmamak ile birlikte DNA metiltransferazların ve metil-bağlayıcı domain proteinleri germ hücrelerinin metilasyonunda önemlidir. Yapılan bazı araştırmalar sonucunda NOA'lı hastalarda metiltetrahidrofolat redüktaz geninin (*MTHRR*) promotor bölgesindeki sitozin-fosfat-guanin adasında (CGI) anormal düzeyde hipermetilasyon görülmüştür. Hipermetile olan bu bölge *MTHRR* geninin enzimatik aktivitesini azaltarak azospermiye neden olduğu bildirilmiştir (13).

NOA genetik olarak kompleks, multifaktoriyel ve fazlasıyla heterojen bir endikasyondur. İnfertil erkeklerin %10'u ve azospermik infertil erkeklerin %60'ını oluştururlar (51). Erkek infertilitesinin en şiddetli formudur (47, 48). NOA, spermatogenezde meydana gelen hatalar sonucunda ejekülatta hiç spermatozoa bulunmadığı endikasyondur (47, 52). Bu hatalar pretestiküler ve/veya testiküler kaynaklı olarak karşımıza çıkmaktadır (13, 47).

Pretestiküler nedenler endokrin bozukluklarından kaynaklanmaktadır. Seks steroid seviyesi düşük ve anormal gonadotropin seviyesi görülmektedir. Endokrin bozuklukları Kallmann sendromu gibi doğuştan, hipofiz bozuklukları gibi edinilmiş veya bir ilacın yan etkisi olarak ikincil olabilir (50).

Testiküler nedenler spermatojenik bozukluğa yol açabilecek konjenital, edinsel ve/veya idiyopatik kaynaklı olabilir. Anorşi, kriptoşidizm, genetik anomaliller (Y kromozomu delesyonları), Sertoli hücreli sendromu ve matürasyon duraklaması konjenital testis oluşumuna neden olmaktadır. Travma, torsiyon, enfeksiyon (kabakulak), testis tümörleri, ilaçlar, cerrahi operasyonlar, siroz ve böbrek yetmezliği gibi sistemik hastalıklar ve varikosel edinilmiş testis oluşumuna neden olmaktadır (50).

NOA'ya neden olan veya olabileceği düşünülen genetik nedenler ön görülmüştür. Ama NOA'nın etiyolojisinin %50-80'i idiyopatiktir yani nedeni hala tam olarak bilinmemektedir (46, 48).

NOA İLE İLİŞKİLİ OLAN VEYA OLABİLME İHTİMALİ YÜKSEK OLAN GENLER

TERB1 (Telomere Repeats-Binding Bouquet Formation Protein 1)

OMIM*617332- Kromozom 16q22.1 üzerinde lokalize olup, 47,211 baz uzunluğunda ve 727 amino asit kodlamaktadır (53, 54). *TERB1* mayoza özel telomer bağlayıcı proteinlerden bir tanesidir. Kromozomların telomerik uçları nükleer zarf bağlanması ve iç nükleer zar boyunca gerçekleşecek hareketlerde aktif rol almaktadır (55). Bu telomerik uçların bağlanması ve hareketleri homolog eşleşme ve rekombinasyon için gereklidir. *TERB1* homolog eşleşme ve rekombinasyon için mayoz profaz 1 aşamasında kromozom hareketlerini düzenlemektedir. Erkek ve kadın infertilitesinde mayozun tamamlanması için *TERB2* (Telomere repeats-binding bouquet formation protein 2), *TERB1* ve *MAJIN* ile etkileşime girerek mayotik telomer kompleksini (MTC) oluştururlar (1, 56, 57). Bu üç gende meydana gelebilecek herhangi bir değişim, erkeklerde NOA ile sonuçlanmaktadır (1, 56). *TERB1* geni ile ilişkili hastalıklarda spermatojenik hata 60 (SPGF60) (OMIM*619646) yer almaktadır (53, 54).

MAJIN (Membrane-Anchored Junction Protein)

OMIM*617130- Kromozom 11q13.1 üzerinde lokalize olup, 34,592 baz uzunluğunda ve 176 amino asit kodlamaktadır (58, 59). DNA bağlayıcı bir transmembran proteindir. *TERB2*

ve *TERB1* ile MTC kompleksi oluşturarak kromozomların telomerik uçlarını iç nükleer membrana bağlar (1, 56, 57, 60). DNA bağlanma aktivitesi ile telomer bağlanmasını stabilize eder (60).

***MTRR* (5-Methyltetrahydrofolate-Homocysteine Methyltransferase Reductase)**

OMIM*****602568- Kromozom 5p15.3 üzerinde lokalize olup, 54,840 baz uzunluğunda ve 698 amino asit kodlamaktadır (61, 62). Metionin sentaz redüktaz olarak da bilinmektedir. Folat ve homosistein metabolik mekanizmalarının en önemli üç enzimlerinden bir tanesidir. DNA sentezi ve metilasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Folat-aracılı tek-karbon metabolizmasında yer alan genlerin spermatogenez sürecinde önemli bir katkısı bulunmaktadır (63). Folatlar, spermatogenezde yer alan homosistein metabolizmasına katılarak DNA, RNA ve histon metilasyonunda aktif rol alırlar. Bu nedenle, folat metabolizmasında rol oynayan *MTRR* genindeki mutasyonların erkeklerde infertiliteye neden olduğu düşünülmektedir (64-68). *MTRR* geni ile ilişkili hastalıklar arasında Homosistinüri-megaloblastik anemi (cbl E tipi) (OMIM*****236270) ve folata duyarlı nöral tüp defektleri (OMIM*****601634) yer almaktadır (61, 62).

***PIWIL1* (Piwi Like RNA-Mediated Gene Silencing 1)**

OMIM*605571- Kromozom 12q24.33 üzerinde lokalize olup, 74,822 baz uzunluğunda ve 861 amino asit kodlamaktadır (69, 70). Argonaute proteinlerinin evrimsel olarak korunan PIWI alt ailesinin bir üyesidir (71, 72). *PIWIL1*, insan testisinde lokalizedir (73). Artan global DNA metilasyonu yoluyla karsinogenez ve erkek infertilitesine yol açar (74). Aynı zamanda germline ve hematopoetik kök hücrelerde kendini yenileme mekanizmasının düzenlenmesinde rol oynar (72). Spermatogenezde eksprese edilir (75). *PIWIL1* geni ile ilişkili hastalıklar arasında erkek infertilitesi ve infertilite yer almaktadır (70).

***SOX10* (SRY-Box Transcription Factor 10)**

OMIM*602229- Kromozom 22q13.1 üzerinde lokalize olup, 16,737 uzunluğunda, 5 ekzona sahip ve 466 amino asit kodlamaktadır (76, 77). SOX transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir. Embriyonik gelişimin düzenlenmesi ve hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynar. Nöral krest ve periferik sinir gelişimi için de önemlidir (72). Bu gendeki varyantlar Waardenburg-Hirschsprung ve Waardenburg-Shah sendromuna (78) ve bu genin aşırı ekspresyonu cinsiyetin tersine çevrilmesine neden olabilir (79). *SOX10* geni ile ilşkili hastalıklar arasında PCWH (Peripheral Demyelinating Neuropathy, Central Dysmyelination, Waardenburg Syndrome, And Hirschsprung Disease) sendromu (OMIM*****609136), Waardenburg sendromu, tip 2E

(nörolojik tutulum olan veya olmayan) (OMIM*****611584) ve Waardenburg sendromu, tip 4C (OMIM*****613266) yer almaktadır (76, 77).

***SIRPG* (Signal Regulatory Protein Gamma)**

OMIM*605466- Kromozom 20p13 üzerinde lokalize olup, 57,365 baz uzunluğunda, 6 ekzona sahip ve 387 amino asit kodlamaktadır (80, 81). Sinyal düzenleyici protein (SIRP) ailesinin üyelerinden bir tanesidir. Aynı zamanda immünoglobin süper ailesine ait bir membran glikoproteinidir. CD47 ile bağlanması sonucunda hücre yapışmasını düzenler ve apoptozu indükler (82). Yapılan bazı çalışmalarda *SIRPG* genindeki nadir varyantların NOA ile ilişkili olabileceği ve spermatogenezde rol oynayabileceği ön görülmüştür. Gende ki bu değişimler ekspresyon seviyesini değiştirerek erkek infertilitesine neden olabilir (83-85).

***SIRPA* (Signal Regulatory Protein Alpha)**

OMIM*602461- Kromozom 20p13 üzerinde lokalize olup, 46,426 baz uzunluğunda ve 504 amino asit kodlamaktadır (86, 87). SIRP ailesinin üyelerinden bir tanesidir. Aynı zamanda immünoglobin süper ailesine ait bir membran glikoproteinidir. İnsan hematopoietik kök hücrelerin hibritleşmesinde ve oligozoospermide rol oynamaktadır (83-85). Yapılan bazı çalışmalarda *SIRPG* genindeki nadir varyantların NOA ile ilişkili olabileceği ve spermatogenezde rol oynayabileceği ön görülmüştür (83, 84).

***DNAH6* (Dynein Axonemal Heavy Chain 6)**

OMIM*603336- Kromozom 2p11.2 üzerinde lokalize olup, 360,018 baz uzunluğunda ve 4158 amino asit kodlamaktadır (88, 89). Dinein proteinleri ailesine dâhildir. Testis, yumurtalık, beyin ve akciğer gibi silia içeren dokularda ekspresyonu yüksektir. Bu gendeki varyantların spermatazoa kamçısının çoklu morfolojik anomalileri, globozoospermi, NOA ve primer siliyer diskinezi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (90-95).

***MEI1* (Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein 1)**

OMIM*608797- Kromozom 22q13.2 üzerinde lokalize olup, 99,975 baz uzunluğunda, 16 ekzona sahip ve 1274 amino asit kodlamaktadır (96-99). Testis dokusunda eksprese edilir. Normal mayotik kromozom sinapsi ve spermatogenezde rol oynar (100). *MEI1* geninde oluşabilecek varyantlar sonucunda spermatogenezde mayoz aşamasında mayotik çift zincir kırıklarının (DSBs) oluşumuna neden olur. Spermatogenezde erken mayotik duraklama sonucunda

kusurlu spermatogeneze neden olur. Bu gendeki varyantlar hidatidiform mol, düşükler ve infertilite ile ilişkilidir (98-101).

***DNAH17* (Dynein Axonemal Heavy Chain 17)**

OMIM*610063 – Kromozomun 17q25.3 üzerinde lokalize olup, 153,740 baz uzunluğunda, 81 ekzona sahip ve 4462 amino asit kodlamaktadır (102-104). Dinein protein ailesine aittir. Axonemal ağır zincirinin dış dynein kollarından (ODA) bir tanesidir. Ve genellikle cilia ve ciliary doku dışında, sperm ve testiste lokalizedir (104-108). Sperm hareketliliğinde önemli rol oynar. Flagellar yapının stabilitesi için bilenen tek DNAH proteinidir (105). *DNAH17* geninde bulunan biallelic varyantlar şiddetli asthenozoospermia ve flagellanın çoklu morfolojik anomalileri (MMAF) ile ilişkilendirilmiştir. Bu durumdan dolayı bu gende varyant taşıyan erkek hastalarda infertilite görülür (104-108).

***ZMYND15* (Zinc Finger MYND-Type Containing 15)**

OMIM*614312 – Kromozomun 17p13.2 üzerinde lokalize olup, 6287 baz uzunluğunda ve 742 amino asit kodlamaktadır (109, 110). *ZMYND15*, histon deasetilaz-bağımlı bir transkripsiyonel baskılayıcıdır (111). Aynı zamanda spermiyogenez sırasında haploid hücre genlerinin (*Prm1, Tnp1, Spem1, Catpser3*) normal ekspresyonunu kontrol eder ve post-mayotik genler olarak adlandırılırlar (112). *ZMYND15*, insanlarda testislerde yüksek oranda eksprese edilir. Bu geninin inaktivasyonu, *Prm1, Tnp1, Spem1, Catpser3* ve diğer çok sayıda haploid genlerin erken transkripsiyonu sonucunda geç spermatidlerin tükenmesine ve erkek infertilitesine neden olmaktadır. Farelerde yapılan *ZMYND15* inaktivasyonu sonucunda geç spermiyojenik bozulmaya neden olarak azospermi ve tam erkek kısırlığına neden olduğu saptanmıştır (111-114). İnsanlarda ise NOA ve şiddetli oligozospermi ile ilişkilendirilmiştir (114).

***DNAH1* (Dynein Axonemal Heavy Chain 1)**

OMIM*603332 – Kromozomun 3p21.1 üzerinde lokalize olup, 87,488 baz uzunluğunda, 80 ekzona sahip ve 4265 amino asit kodlamaktadır (115-117). Testiste eksprese edilir (117, 118). Aksonemal bileşendir ve iç kol ağır zincir dyneini kodlar. Bu bileşen spermatozoada iç dynein kollarının oluşumunda gereklidir. *DNAH1* geninin fonksiyon kaybı sperm aksonemin organizasyonu ve biyogenezi için zararlıdır ve MMAF (117, 119-124) ve şiddetli astenozospermiye (117, 120, 122, 124) neden olduğu bildirilmiştir. *DNAH1*'deki mutasyonların, MMAF neden olarak erkek infertilitesine yol açtığı gösterilmiştir (117-120, 122-125). Yapılan bazı çalışmalarda azospermi hastalarında da *DNAH1* geninde varyantlar görülmüştür (124).

***DPY19L2* (Dpy19-Like 2)**

OMIM*613893 – Kromozomun 12q14.2 üzerinde lokalize olup, 110,289 baz uzunluğunda (126, 127), 22 ekzona sahip (128, 129) ve 758 amino asit kodlamaktadır (126, 127). Spermatozoada iç nüklear membranda bulunur (130). Testislerde yüksek oranda eksprese edilen, testise özgü 11-domainli bir transmembran proteindir. Spermatagonezde sperm başı uzaması ve akrozom gelişimi için gereklidir (94, 129, 131, 132). İnsanlarda *DPY19L2* geninde meydana gelen delesyonlar genellikle yeterli sperm üretimi ile ilişkilendirilmiştir ve germ hücrelerinin proliferasyonu üzerinde hiçbir etkisi olmamasına rağmen spesifik bir spermiyojenik kusur olarak gösterilmiştir (131). *DPY19L*2 delesyonları globozoosperminin temel nedenlerinden bir tanesi olarak belirtilmiştir (94, 128-134).

***SEPTIN12* (*SEPT12*)**

OMIM*611562 – Kromozomun 16p13.3 üzerinde lokalize olup, 14,021 baz uzunluğunda, 10 ekzona sahip ve 358 amino asit kodlamaktadır (135, 136). SEPTIN gen ailesinin bir üyesidir. Memelilerde yüksek oranda korunmuştur. Testise özgü bir septin olarak tanımlanır. Özellikle post-mayotik erkek germ hücreleri olmak üzere testis dokusunda eksprese edilir. Olgun spermatazoanın boyun ve anulus bölgelerinde bulunur. Spermatazoanın baş-kuyruk oluşumu için gereklidir ve kuyruk halkasının temel bir bileşenidir. Spermatogenez için önemli bir gendir. Bu gende oluşabilecek mutasyonlar spermatojenik hata ve sperm motilite bozukluklarına yol açarak erkeklerde infertiliteye neden olur. Teratozoospermi, oligozoospermi, azospermi (saptanan varyantlar arasında NOA ile ilişkisi bildirilmiştir) hastalarında tespit edilmiştir (137-144).

***KLHL10* (Kelch-Like 10)**

OMIM*609778 – Kromozomun 17q21.2 üzerinde lokalize olup, 12,700 baz uzunluğunda ve 608 amino asit kodlamaktadır(145, 146). Memelilerde evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş bir gendir. Testise özgü bir proteindir ve spermatidlerin sitoplazmasında eksprese edilir. Spermatogenez sürecinde spermatid gelişiminde önemlidir (147-151). Fareler üzerinde yapılan çalışmalar doğrultusunda bu gende haplo yetersizlik sonucunda spermatogenezin bozduğu ve erkek infertilitesine neden olduğu belirtilmiştir (147, 150). Oligozoospermi, oligoastenospermi ve azospermi (özellikle NOA teşhisini alan hastalarda) teşhisi alan hastalarda da *KLHL10* geninde varyantlar saptanmıştır (147-151).

***DDX25* (Dead-Box Helicase 25)**

OMIM*607663 – Kromozomun 11q24.2 üzerinde lokalize olup, 40,375 baz uzunluğunda ve 483 amino asit kodlamaktadır (152-155). Gonadotropinle düzenlenen testiküler helikaz (*GRTH*) olarak da adlandırılmaktadır. İnsan, sıçan ve fare testislerinde eksprese edilen Dead-box helikaz protein ailesinin bir üyesidir. Leydig hücreleri ve mayotik spermatosit ve spermatidler olmak üzere germ hücrelerinde bulunur. Germ hücrelerin gelişimi sırasında ilgili genlerin post-transkripsiyonel düzenleyicisi olarak spermatogenezin tamamlanmasında kritik bir rol oynamaktadır (154-160). Yapılan fare modeli çalışmalarında *DDX25/GRTH* geni içermeyen farelerde yuvarlak spermatidlerin uzamamasına neden olarak spermatojenik duraklama sonucu azospermi ve infertilite gözlenmiştir (157, 158). Bir grup normal ve infertil erkekler üzerinde yapılan çalışma sonucunda da NOA tanısı alan hastalarda *DDX25/GRTH* geninde varyantlar tespit edilmiştir (159).

***LHB* (Luteinizing Hormone, Beta Polypeptide)**

OMIM*152780 – Kromozomun 19q13.33 üzerinde lokalize olup, 1112 baz uzunluğunda ve 141 amino asit kodlamaktadır (161, 162). Glikoprotein hormon beta zincir ailesinin bir üyesidir ve lüteinize edici hormunun beta alt birimini kodlar (162, 163). Lutropin alt birimi (LHβ) olarak da bilinmektedir. Gonad olgunlaşmasında, erkeklerin postnatal gelişiminde ve fertilizasyonda önemli bir rol oynar (163). Fareler üzerinde yapılan *LHB* nakavt çalışmalarında farelerde doğum sonrası gonodal büyümede kusurlar ve infertilite gözlenmiştir (164). Azospermi tanılı hastalarda yapılan araştırmalarda *LHB* geninde mutasyonlar gözlenmiştir (165, 166). Ayrıca, bu genle ilişkili hastalıklarda Anosmili veya Anosmisiz Hipogonadotropik Hipogonadizm 23 ve Hipogonadizm yer almaktadır (161, 162).

***CATSPER1* (Cation Channel, Sperm-Associated, 1)**

OMIM*606389 – Kromozomun 11q13.1 üzerinde lokalize olup, 9767 baz uzunluğunda ve 780 amino asit kodlamaktadır (167, 168). Sperm-spesifik iyon kanalları olarak bilinen CATSPER ailesinin 4 üyesinden bir tanesidir. Voltaj kapılı Ca^{+2} geçirgen bir kanaldır. Sperm kamçısında özellikle sperm kuyruğunun plazma membranında eksprese edilir. Bu gen kalsiyum konsantrasyonunu düzenleyerek sperm motilitesini ve hiperaktivasyonunu düzenler. Aynı zamanda yumurta penetrasyonu için de gereklidir. İnsanda teratozoospermi, astenozoospermi, oligozoospermi ve azoospermi patogenezini etkileyen *CATSPER1* geninde çeşitli varyantlar belirtilmiştir (169-173). Bu gen ile ilişkili hastalıklar arasında Spermatojenik hata 7 (SPGF7) (OMIM*612997) ve Catsper ile ilişkili erkek infertilitesi yer almaktadır (167, 168).

***NPHP4* (Nephrocystin 4)**

OMIM*606966 – Kromozomun 1p36.31 üzerinde lokalize olup, 129663 baz uzunluğunda, 30 ekzona sahip ve 1426 amino asit kodlamaktadır. Bu gen renal tübülerin gelişimi ve fonksiyonu ile ilgili proteini kodlar. Bu gende ki mutasyonlarla ilişki hastalıklarda Nefronofitiz tip 4 (bir böbrek hastalığı) ve Senior-Loken sendromu tip 4 (nefronofitizis ve retinitis pigmentosanın bir kombinasyonu) yer almaktadır (174, 175). 2011 yılında yayınlanan *NPHP4* mutant fareler üzerinde yapılan çalışma sonucunda, yetersiz sperm miktarı ve sperm hareketliliği kaynaklı infertilite görülmektedir (176). 2014 yılında yayınlanan vakada ise, *NPHP4* mutasyonunun neden olduğu ilk Serebellookulo-renal sendromu vakası ve bu gende homozigot kırpma mutasyonu olan hastalarda ilk kez insan erkek infertilitesi gözlenmiştir (177).

***CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)**

OMIM*602421 – Kromozomun 7q31.2 üzerinde lokalize olup, 428,852 baz uzunluğunda, 27 ekzona sahip ve 1480 amino asit kodlamaktadır (178-184). Erkek genital sisteminde bulunan vas deferansı düzenleyen bir membran iyon kanalı proteini kodlar (180-182). Bu gen ile ilişkili hastalıklar arasında Vas deferensin konjenital bilateral yokluğu (CBAVD), Kistik fibroz (KF), KF olmadan ter klorür yüksekliği, Ter klorür yüksekliği olan veya olmayan bronşektazi 1 (değiştiricisi), Hipertripsinemi (yenidoğan), Pankreatit (kalıtsal) yer alır (178, 179). Bu gende meydana gelecek mutasyonlar sonucunda erkeklerde infertilite gözlenmiştir. Genellikle, KF hastalarında obstrüktif azospermiye neden olan CBAVD gözlenmiştir (181-186). Ayrıca *CFTR* patojenik varyantlarının CBAVD-olmayan azospermilere de neden olabilmektedir (187). Hayvan ve insan üzerinde yapılan çalışmalar sonucu verilerde, NOA tanılı erkeklerde *CFTR*'ın aşağı regülasyonunu ve spermde *CFTR* mutasyonlarını barındıran erkeklerde sperm motilitesini ve fertilizasyon kapasitesini azalttığını göstermiştir (180, 185).

***FKBPL* (FK506-Binding Protein-Like)**

OMIM*****617076 – Kromozomun 6p21.32 üzerinde lokalize olup, 1582 baz uzunluğunda, 2 ekzona sahip ve 349 amino asit kodlamaktadır (188, 189). FK506 bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir. İmmünoregülasyon ve temel hücresel süreçlerde hayati bir rol oynayan immünofilin protein ailesine benzemektedir (190). *FKBPL* geni DIR1 ve WISp39 olarak da adlandırılır (191, 192). İnsanlarda sertoli ve leydig hücreleri de dâhil olmak üzere testis dokusunda güçlü bir şekilde eksprese edilir ve testiste androjen reseptörü aracılı sinyalleşmeye katılır (190-192). *FKBPL* geni, Japon ve İrlandalı infertil hastalarla yapılan çalışmalarda azospermiden sorumlu

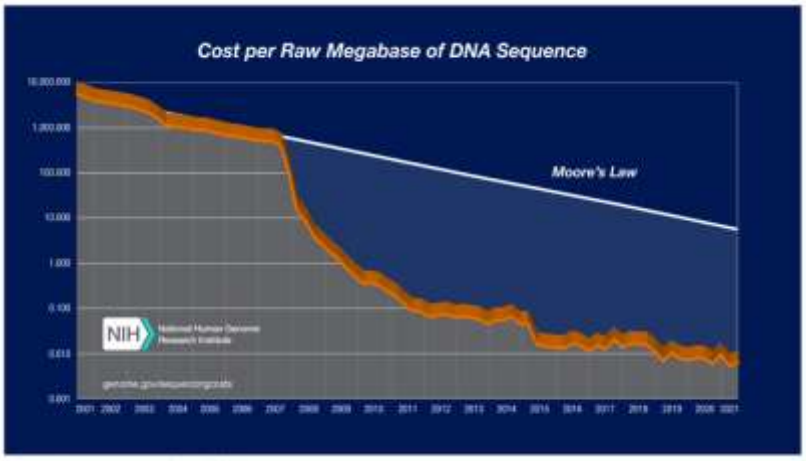
olduğu bildirilmiştir Nadir olarak görülse de *FKBPL* geninde oluşabilecek mutasyonlar erkek infertilitesine neden olabileceğini göstermektedir (190-193).

YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ (NGS)

Bilim dünyası uzun yıllardır DNA'da hastalığa yatkınlığa ve hasta olmasına neden olan varyantları keşfetmek için çeşitli teknikler geliştirmiştir ve geliştirmeye devam etmektedir. Bunlardan günümüzde hala kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen Sanger dizileme yöntemi diğer adı ile zincir sonlandırma reaksiyonu 1977 yılında Sanger ve ark.'ları tarafından geliştirilerek 1980 yılında Nobel Kimya ödülü almıştır (194, 195).

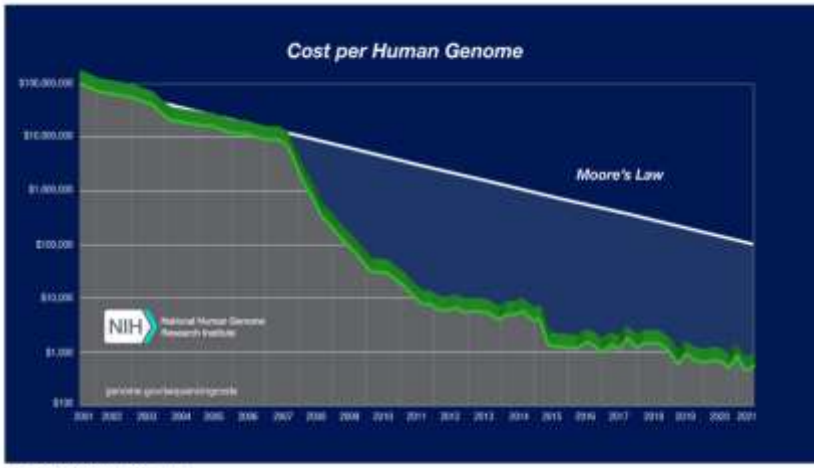
Bilim dünyasında büyük bir ses getiren İnsan Genom Projesi (Human Genome Project (HGP)), 1990-2002 yılları arasında Sanger dizileme yöntemi kullanılarak sadece bir kişinin tüm genomu dizilenmiştir. Sanger dizileme yöntemini güncel olarak kullanıyor olmasına rağmen kısa okuma uzunluğu, okuma derinliğine sahip olmaması, nükleotid başı maliyet ve zaman açısından limitasyonlara sahiptir (194, 195).

Yeni nasıl dizileme diğer adları ile masif paralel dizileme veya yüksek verimli dizileme tekniği binlerce veya milyonlarca DNA (veya tamamlayıcı DNA) ve RNA dizilerini aynı anda dizilimini sağlayan, ilgili gen veya gen bölgelerinin eş zamanlı olarak analiz etme yeteneğine sahip yüksek verimlilikle çalışan bir platformdur (196). Ulusal İnsan Genomu Araştırma Enstitüsü'nün (National Human Genome Research Institute (NHGRI)) Ağustos 2021 son verilerine göre DNA dizisinin 1 mega baz başına maliyeti $0,006 ve genom başına maliyeti $562 olarak tanımlanmıştır (Şekil 2-Şekil 3) (197). Geleneksel olarak adlandırdığımız Sanger dizileme tekniğine kıyasla NGS tekniği, binlerce hatta milyonlarca sıralı dizileri tek seferde yüksek dizileme kapasitesi, daha az maliyet ile daha kısa sürede dizilimini sağlar. Ama kendi içinde birtakım limitasyonlara da sahiptir. Bunlar; varyant tespitinin duyarlılığı, genomda dizilenmesi veya analiz edilmesi zor olan alanlar, yeni veya nadir görülen varyantların yorumlanmasındaki bilgi kısıtlamaları, yapısal gen varyasyonları veya kopya sayısı değişikliklerinin tespit edilme yeteneği kısıtlaması ve hastaların tıbbi durumu ile ilişkili genomik bilgilerin uyumudur (196).



Sequencing cost per megabase - 2021

Şekil 2. DNA dizisinin megabaz başına maliyeti (NHGRI)(197)



Cost per genome data - 2021

Şekil 3. Genom başına maliyeti (NHGRI)(197)

Son yıllarda yapılan NGS tabanlı yayınların sayısında ciddi bir artış görülmektedir. Bu yayınlar ile NGS platformu geniş bir kullanım alanına sahip olduğunu göstermektedir. Geniş kullanım alanları şunları içermektedir: tüm genom dizileme (whole genome sequencing (WGS)), eksozom dizileme (exomic DNA-seq), hedeflenen gen bölgeleri için paneller, genomik RNA veya transkriptom dizileme (RNA-seq), mitokondriyal DNA dizileme, genom boyunca uzanan DNA metilasyon bölgelerinin dizilenmesi (Methyl-seq), kromatin immünopresipitasyon dizileme (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-seq)), genomun üç boyutlu yapısını inceleme yöntemi (Hi-C). Bu kullanım alanları toplumda yaygın görülen ve nadir görülen hastalıkların genetik nedenlerinin teşhisi ve tedavi takipleri, prenatal genetik tanıda, kanser teşhisi, takibi ve bu alanda yapılan çalışmalarda, evrim ve popülasyon genetiği çalışma-

larında, insan lökosit antijen (HLA) tiplemesinde, mtDNA hastalıklarının teşhisinde ve bu alandaki çalışmalarda, adli tıp alanında, farmakogenetik, transkriptom, metagenomik, immünolojik, mikrobiyoloji ve tarımsal alanda yapılan çalışmalarda kullanılır (195, 196, 198, 199).

Bilim dünyasında NGS gibi önemli bir yol gösterici olarak geliştirilen teknolojiler insan hastalıklarının temelinde yatan genetik nedenlerin tanı, teşhis, tedavi ve verilecek olan genetik danışmanlıklarda büyük bir rol almaktadır. Biz de NGS teknolojisini NOA'nın genetik etiyolojinin araştırılması için tercih ettik.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

HASTALAR

Çalışmaya Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi polikliniğine Haziran 2021 – Mayıs 2022 tarihleri arasında NOA tanısı ile müracaat eden 40 hasta dâhil edildi. Hastaların yaşları 22 ile 43 arasında değişiklik göstermektedir. Yaş ortalaması 32'dir.

HASTA SEÇİMİ

Vakaların hasta öyküsü alınmış olup, fiziksel muayeneleri yapılıp, var olan laboratuvar bulguları, geçmiş bilgileri, en az 3 kuşağı içeren soy geçmiş bilgileri ve soyağacı standart bir hasta formuna kayıt edildi. NOA hasta değerlendirme formu oluşturulup, bütün vakaların izinleri alındı. Vakaların çalışmaya dahil edilebilmesi için belirli kriterler oluşturuldu. Bu kriterler;

- Normal erkek karyotipine sahip olması (46, XY/erkek fenotipi)
- Y mikrodelesyonu saptanmaması
- NOA tanısı alması

Vakaların çalışmaya dahil edilmemesi için belirli kriterler oluşturuldu. Bu kriterler;

- Normal erkek karyotipine sahip olmaması (46, XY/erkek fenotipi)
- Y mikrodelesyonu saptanması
- NOA tanısı almaması

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

NOA tanısı almış hastalara yapılacak olan çalışma ile ilgili bilgiler hem telefonda hem de yüz yüze verilerek, araştırmanın içeriğini ve kullanılacak yöntemi özetleyen, hastanın araştırmayla ilgili sahip olduğu hakları ve sorumlulukları bildiren 'Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi Yeni Nesil Dizileme ile Çalışılan Testler İçin Aydınlatılmış Onam Formu', çalışmaya dâhil olmayı kabul eden 40 hastamıza okutulup, yazılı onayları alınarak saklandı (Ek 1).

ETİK KURUL VE TÜBAP ONAYI

Çalışmanın etik kurul onayı, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulunun 26.04.2021 tarih, 10/21 karar numarası ve sayılı belgesi (TÜTF-BAEK 2021/210) ile alındı (Ek 2).

Çalışmanın TÜBAP onayı Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından 14.09.2021 tarih, 2021/09 sayılı toplantısında 2021/114 proje numarası ile desteklenmesine karar verildi.

MATERYAL

Çalışmaya Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi polikliniğine NOA tanısı ile başvuran 40 hastadan 2 adet EDTA'lı tüpte kan istendi. Bir tüp çalışma için kullanılırken diğer tüp saklanmak üzere +4 °C'ye kaldırıldı.

GEREÇLER

Çalışmada kullanılan sarf malzemeler Tablo 2'de, cihazlar ise Tablo 3'te belirtilmektedir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Kullanılan Sarf Malzemeler		
Malzeme	**Marka**	**Ülke**
Fragmentasyon Buffer, 10X	Qiagen	Hilden, Almanya
Fragmentasyon Enzim Mix	Qiagen	Hilden, Almanya
FERA Solüsyonu	Qiagen	Hilden, Almanya
Ligasyon Buffer, 5X	Qiagen	Hilden, Almanya
DNA Ligaz	Qiagen	Hilden, Almanya
Ligasyon Solüsyonu	Qiagen	Hilden, Almanya
TEPCR Buffer, 5X	Qiagen	Hilden, Almanya
UPCR Buffer, 5X	Qiagen	Hilden, Almanya
HotStar Tag DNA Polimeraz	Qiagen	Hilden, Almanya
QIAseq Purifikasyon Bead	Qiagen	Hilden, Almanya
Nükleaz İçermeyen Su	Qiagen	Hilden, Almanya
İlgili Genlere Özel Primerleri İçeren Custom Probe	Qiagen	Hilden, Almanya
IL-N7## Index Adaptör	Qiagen	Hilden, Almanya
IL-S5## Index Adaptör	Qiagen	Hilden, Almanya
%99,9 Etanol	Qiagen	Hilden, Almanya
Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	ABD
QIAseq™ Library Quant Assay Kit	Qiagen	Hilden, Almanya
EZ1 DNA Blood izolasyon kiti	Qiagen	Hilden, Almanya
0.2 ml Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Tüpü	Axygen Biosciences	Union City, ABD
1.5 ml LoBind Tüpü	Eppendorf	Hamburg, Almanya
Qubit Assay Tüp	Thermo Fisher Scientific	ABD
15 ml'lik Falkon Tüp	Isolab	Türkiye
50 ml'lik Falkon Tüp	Isolab	Türkiye
NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 Cycles) (Flowcell, Buffer, Kartuş)	Illumina	Cambridge, İngiltere
Distile Su	Qiagen	Hilden, Almanya
Qiaseq (Targeted DNA Sequencing) Paneli	Qiagen	Hilden, Almanya
QIAseq A Read 1 Primer	Qiagen	Hilden, Almanya

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihazlar		
Malzeme	**Marka**	**Ülke**
EZ1 Advanced XL Otomatik Nükleik Asit İzolasyon Cihazı	Qiagen	Hilden, Almanya
Nanodrop 2000C	Thermo Fisher Scientific	ABD
Vorteks	LMS	Tokyo, Japonya
Santrifüj	Thermo Fisher Scientific	ABD
Single-Channel Pipetler (0,2-10ul / 2-20 ul / 20-100 ul/ 100-1000ul)	Eppendorf	Hamburg, Almanya
Multi-Channel Pipet (2-20 ul)	Eppendorf	Hamburg, Almanya
DynaMag -2 Magnet	Thermo Fisher Scientific	ABD
DynaMag-96 Side	Thermo Fisher Scientific	ABD
+4°C Soğuk Blok	Qiagen	Hilden, Almanya
Sensquest Thermal Cycler (PCR Cihazı)	Labcycle	Hilden, Almanya
Applied Thermal Cycler (PCR Cihazı)	Thermo Fisher Scientific	ABD
Qubit 4 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific	ABD
QIAgility	Qiagen	Hilden, Almanya
Rotor-Gene Q Real-Time PCR	Qiagen	Hilden, Almanya
NextSeq™ 550 Sequencing System	Illumina	Cambridge, İngiltere
Applied Biosystem 3130 XL (Sanger sekans dizileme cihazı)	Thermo Fisher Scientific	ABD

YÖNTEMLER

Çalışmanın ıslak laboratuvar basamağı Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ıslak laboratuvar aşamasında kullanılan yöntemler sırasıyla aşağıda belirtilmiştir.

Hedeflenmiş Gen Panelinin Hazırlanması

NOA ve genetik etiyolojisi hakkında bilgi verebilecek ilgili literatürlerin ve veri tabanlarının taranması yapıldı. Yapılan bu taramalar sonucunda, NOA ile ilişkili olduğu ve olabileceği düşünülen 21 gen çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen ilgili genlerin kodlama yapan tüm ekzon bölgeleri ile tüm ekzon/intron splice bölgelerini kapsayacak şekilde tarafımızca primerler tasarlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen genler: *TERB1, MAJIN, MTRR, PIWIL1, SOX10, SIRPG, SIRPA, DNAH6, MEI1, DNAH17, ZMYND15, DNAH1, DPY19L2, SEPTIN12, KLHL10, DDX25, LHB, CATSPER1, NPHP4, CFTR* ve *FKBPL* genleridir (Tablo 4).

Tablo 4. Çalışılan genler ve bilgileri

No	Gen	Gen Tanımı	Lokasyon	Transkript ID
1	*TERB1*	Telomere repeats-binding bouquet formation protein 1	16q22.1	ENSG00000249961
2	*MAJIN*	Membrane-anchored junction protein	11q13.1	ENSG00000168070
3	*MTRR*	5-Methyltetrahydrofolate-Homocysteine Methyltransferase Reductase	5p15.3	ENSG00000124275
4	*PIWIL1*	Piwi Like RNA-Mediated Gene Silencing 1	12q24.33	ENSG00000125207
5	*SOX10*	SRY-Box Transcription Factor 10	22q13.1	ENSG00000100146
6	*SIRPG*	Signal Regulatory Protein Gamma	20p13	ENSG00000089012
7	*SIRPA*	Signal Regulatory Protein Alpha	20p13	ENSG00000198053
8	*DNAH6*	Dynein Axonemal Heavy Chain 6	2p11.2	ENSG00000115423
9	*MEI1*	Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein 1	22q13.2	ENSG00000167077
10	*DNAH17*	Dynein Axonemal Heavy Chain 17	17q25.3	ENSG00000187775
11	*ZMYND15*	Zinc Finger MYND-Type Containing 15	17p13.2	ENSG00000141197
12	*DNAH1*	Dynein Axonemal Heavy Chain 1	3p21.1	ENSG00000114841
13	*DPY19L2*	Dpy19-Like 2	12q14.2	ENSTG00000177990
14	*SEPTIN12*	SEPTIN12; Sept12	16p13.3	ENSG00000140623
15	*KLHL10*	Kelch-Like 10	17q21.2	ENSG00000161594
16	*DDX25*	Dead-Box Helicase 25	11q24.2	ENSG00000109832
17	*LHB*	Luteinizing Hormone, Beta Polypeptide	19q13.33	ENSG00000104826
18	*CATSPER1*	Cation Channel, Sperm-Associated, 1	11q13.1	ENSG00000175294
19	*NPHP4*	Nephrocystin 4	1p36.31	ENSG00000131697
20	*CFTR*	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator	7q31.2	ENSG00000001626
21	*FKBPL*	FK506-Binding Protein-Like	6p21.32	ENSG00000204315

Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi polikliniğinde NOA tanısı ile müracaat eden hastalardan alınan 2ml periferik kan örneklerinden EZ1 DNA BLOOD izolasyon kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) ile EZ1 Advanced XL otomatik nükleik asit izolasyon cihazında (Qiagen, Hilden, Almanya) genomik DNA (gDNA) eldesi için DNA izolasyonu yapıldı. Cihazdan gDNA'nın son hacmi 100 ul olacak şekilde izolasyon ayarlaması yapıldı.

DNA Konsantrasyon Ölçümü

İzolasyon sonrası elde edilen gDNA'nın kalite ölçümleri konsantrasyonları ve saflık değerleri için NanoDrop cihazı (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı. gDNA'ların saflık dereceleri 260/280 oranı 2 ve 2'den düşük olması ve konsantrasyonları 20 µl/ng'ın altında olmaması temel alınarak konsantrasyon ölçümleri gerçekleştirildi. İzole olan hastaların her birine hasta hakları ve etik değerler altında özel laboratuvar kodları verilerek, DNA'lar uygun şartlar doğrultusunda -20°C derin dondurucuda saklandı.

DNA Hazırlığı ve Kalite Kontrolü

Hastaların DNA'ları Qubit ölçümü için oda sıcaklığına çıkarıldı. Qubit Standart 1, Standart 2 ve HS Buffer (Qubit dsDNA High Sensitivity Assay kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD)) oda sıcaklığına çıkartılıp karanlık bir ortamda bekletildi. Nanodprop ölçümleri sonucunda DNA miktarının 10-40 µl/ng olması gerekmektedir. NanoDrop ölçümleri 40 µl/ng'ın üzerinde olan hasta DNA'ları 3 µl nükleaz içermeyen su ve 3 µl DNA olacak şekilde dilüe edilip Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında ölçümü yapıldı.

Fragmentasyon

- Qubit ile DNA kalite ölçümleri yapılarak konsantrasyonları 10-40 µl/ng aralığında olan örneklerden 16,75 µl DNA soğuk blok üzerinde bulunan 0,2'lik PCR tüplerine aktarıldı.
- DNA fragmentasyonu için son hacim 25 µl olacak şekilde Tablo 5'te yer alan içerikler her hasta DNA'sının bulunduğu tüplerin üzerine pipetaj yapılarak teker teker eklendi.

Tablo 5. Fragmentasyon PCR içerikleri ve miktarları

İçerik	Hacim
DNA	16,75 µl
Fragmentasyon Buffer, 10x	2,5 µl
Fera Solüsyon	0,75 µl
Fragmentasyon Enzimi	5 µl
Toplam	**25 µl**

- Thermal cycler'ın ısısı +4°C'ye getirildi. Soğuk blok üzerindeki PCR tüpleri cihaza yerleştirildi. Fragmentasyon PCR aşaması başlatıldı. Fragmentasyon PCR koşulları Tablo 6'da yazılan gibidir.

Tablo 6. Fragmentasyon PCR koşulları

Basamak	Derece	Süre
1	4 °C	1 dakika
2	32 °C	24 dakika
3	72 °C	30 dakika
4	4 °C	1 dakika

Adaptör Ligasyonu (UMI ve Index Eklenmesi)

- Fragmentasyon PCR aşaması biter bitmez örnekler soğuk blok üzerine alındı.
- Bu aşamada fragmente olan DNA'ya UMI (Unique Molecular İndex) ve IL-N7 adaptör index işaretlenmesi yapılmaktadır. IL-N7 adaptörlerde 700'lü olan set (701-729) kullanıldı. 8 hastada bir kombinasyon yapılarak adaptörler belirlendi.
- Fragmente olan DNA örneklerinin bulunduğu tüplere Tablo 7'de belirtilen miktarlarda ilgili içerikler eklendi.

Tablo 7. Adaptör ligasyonu içerikleri ve miktarları

İçerik	Hacim
DNA	25 µl
Ligasyon Buffer, 5x	10 µl
IL-N7 adaptör	2,8 µl
DNA ligaz	5 µl
Ligasyon Solüsyonu	7,2 µl
Toplam	**50 µl**

- PCR cihazına yerleştirilmeden önce kısa süreli vortex ve spin yapıldı. Thermal cycler'ın kapak ısısı kapatılıp, cihaz 20°C ayarlandı. Örnekler cihaza yerleştirildi ve 15 dk inkübe edildi.

- Adaptöre bağlanmış DNA parçalarının temizlenmesi için QIAseq Bead'ler (manyetik boncuklar) kullanıldı.
- Son hacmi 50 µl olan örnekler cihazdan alındı. Örnekler 1,5 ml'lik DNA Lobind tüplere aktarıldı. Örneklerin üzerine 50 µl nükleaz içermeyen su ve 100 µl QIAseq Bead eklendi.
- Homojen olacak şekilde pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Ardından DynaMag-2 Magnet (Thermo Fisher Scientific, ABD) üzerinde Bead'lerin süpernatanttan ayrılması için 10 dakika bekletildi.
- Süpernatant berraklaştıktan sonra hedef DNA'yı içeren Bead'lere temas etmeden dikkatli bir şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve atıldı.
- DynaMag-2 Magnet üzerindeki örneklere 200 µl taze hazırlanmış %80'lik etanol eklendi. Örnekler DynaMag-2 Magnet üzerinde 90^{o} 'lik açılarla sağ-sol yapılarak Bead'ler yıkandı. Dikkatli bir şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve atıldı.
- Etanol ile yıkama işlemi tekrarlandı. 2. yıkamadan sonra etanolün tamamen uzaklaştırılması için 200 µl'lik pipet ile atıldı, kalan sıvı ise 10 µl'lik pipet ile uzaklaştırıldı ve atıldı.
- Etanolden tamamen uzaklaştırdığımıza emin olduktan sonra DynaMag-2 Magnet üzerinde tamamen kuruması için örnekler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Sürenin sonunda tüpler DynaMag-2 Magnet üzerinden alındı. DNA hedef Bead'ler 52 µl nükleaz içermeyen su ile iyi bir pipetaj yapılarak dilüe edildi. Dilüe edilen örnekler tekrardan DynaMag-2 Magnet üzerine alındı. Süpernatant tamamen berraklaşana kadar bekletildi.
- Tüpte bulunan 50 µl'lik DNA süpernatantı, temiz 1,5 ml'lik Lobind tüp içerisine alındı. Üzerine 50 µl QIAseq Bead iyi bir pipetaj ile aktarıldı.
- Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Örnekler DynaMag-2 Magnet üzerine alınarak 5 dakika daha inkübe edildi. Hedef DNA'yı içeren Bead'lere dokunmadan süpernatant atıldı.
- DynaMag-2 Magnet üzerindeki örneklere 200 µl taze hazırlanmış %80'lik etanol eklendi. Örnekler DynaMag-2 Magnet üzerinde 90^{o} 'lik açılarla sağ-sol yapılarak Bead'ler yıkandı. Dikkatli bir şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve atıldı.

- Etanol ile yıkama işlemi tekrarlandı. 2. yıkamadan sonra etanolün tamamen uzaklaştırılması için 200 µl'lik pipet ile atıldı, kalan sıvı ise 10 µl'lik pipet ile uzaklaştırıldı ve atıldı.
- DynaMag-2 Magnet üzerindeki tüpler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
- Örnekler DynaMag-2 Magnet üzerinden alındı. DNA hedef Bead'ler 12 µl nükleaz içermeyen su ile pipetaj yapılarak dilüe edildi.
- Dilüe edilen örnekler tekrardan DynaMag-2 Magnet üzerine alındı. Süpernatant berraklaştıktan sonra 9,4 µl süpernatant temiz 0,2 µl'lik PCR tüplerine aktarıldı.

Hedef Zenginleştirme PCR

- Hedef zenginleştirme PCR aşamasında sentetik oligonükleotidler kullanılarak gerçekleştirildi. Sentetik oligonükleotidler ilgili genleri içererek hedef zenginleştirme aşamasıdır.
- Aşağıda bulunan Tablo 8'e göre reaksiyon miksi hazırlandı. Pipetaj yapıldı, kısa süreli spin atıldı.

Tablo 8. Hedef zenginleştime PCR içerikleri ve miktarları

İçerik	Hacim
DNA Kitaplığı	9,4 µl
TEPCR buffer, 5x	4 µl
QIAseq Targeted DNA Panel	5 µl
IL-Forward primer	0,8 µl
HotSTAR Taq DNA polimeraz	0,8 µl
Toplam	**20 µl**

- Tablo 9'da belirtilen uygun koşullara göre Thermo cycler ayarlandı ve hedef zenginleştirme PCR aşaması başlatıldı.

Tablo 9. Hedef zenginleştirme PCR koşulları

Basamak	Süre	Derece
İlk denatürasyon	13 dakika 2 dakika	95 °C 98 °C
6 döngü	15 saniye 15 dakika	98 °C 65 °C
1 döngü	5 dakika	72 °C
Bekleme (en az 5 dakika)		4 °C

Hedef Zenginleştirme PCR Sonrası QIAseq Bead ile Temizleme

- PCR bitiminde örnekler soğuk blok üzerine alındı.
- Tüm PCR ürünleri 1,5 ml'lik LoBind tüplere aktarıldı. Üzerine 80 µl nükleaz içermeyen su ve 100 µl QIAseq Bead eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Ardından DynaMag-2 Magnet üzerine alındı, tekrar 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Berraklaşan süpernatant uzaklaştırıldı ve atıldı.
- DynaMag-2 Magnet üzerindeki örneklere 200 µl taze hazırlanmış %80'lik etanol eklendi. Örnekler DynaMag-2 Magnet üzerinde 90^{o} 'lik açılarla sağ-sol yapılarak Bead'ler yıkandı. Dikkatli bir şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve atıldı.
- Etanol ile yıkama işlemi tekrarlandı. 2. yıkamadan sonra etanolün tamamen uzaklaştırılması için 200 µl'lik pipet ile atıldı, kalan sıvı ise 10 µl'lik pipet ile uzaklaştırıldı ve atıldı.
- DynaMag-2 Magnet üzerindeki tüpler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
- Hedef DNA'nın tutunduğu Bead'ler 16 µl nükleaz içermeyen su ile dilüe edildi. Pipetaj ile iyice karıştırıldı. Tekrar DynaMag-2 Magnet üzerine alındı ve Bead'ler tamamen manyetik alana tutunana kadar bekletildi. Şeffaflaştıktan sonra 13,4 µl süpernatant IL-S5## Index'ler içeren strip tüplere aktarıldı.

Universal PCR Amplifikasyonu

- Universel PCR amplifikasyonu aşaması, içerisinde liyoflize halde bulunan birbirinden farklı IL-S5## Index'ler içeren strip tüpler kullanıldı.

- IL-S5## Index'ler içeren strip tüplere aktarılan 13,4 µl süpernatant üzerine Tablo 10'da belirtilen universal PCR amplifikasyon reaksiyon miksi hazırlandı.

Tablo 10. Universal PCR içerikleri ve miktarları

İçerik	Hacim
Zenginleştirilmiş hedef DNA	13,4 µl
UPCR buffer, 5x	4 µl
HotStart Taq DNA polimeraz	1 µl
Nükleaz içermeyen su	1,6 µl
Toplam	**20** µl

- Hazırlanan miksten 6,6 µl her bir kuyucuğa aktarılıp pipetaj yapıldı.
- Tablo 11'de verilen PCR koşulları ayarlanarak universal PCR amplifikasyonu başlatıldı.

Tablo 11. Universal PCR koşulları

Basamak	Derece	Süre
Denatürasyon	95 °C 98 °C	13 dakika 2 dakika
20 döngü	98 °C 60 °C	15 saniye 2 dakika
1.döngü	72 °C	5 dakika
Bekleme	4 °C	5 dakika
	4 °C	(Sonsuz)

Universal PCR Amplifikasyon Sonrası QIAseq Bead ile Temizleme

- PCR ürününden 20 µl 1,5 ml'lik LoBind tüpe aktarılır. Üzerine 80 µl nükleaz içermeyen su ve 100 µl QIAseq Bead eklendi. Pipetaj ile homojenize edildi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

- Ardından DynaMag-2 Magnet üzerine alındı ve 5 dakika bekletildi. Berraklaşan süpernatant uzaklaştırıldı ve atıldı.
- DynaMag-2 Magnet üzerindeki örneklere 200 µl taze hazırlanmış %80'lik etanol eklendi. Örnekler DynaMag-2 Magnet üzerinde 90^{o} 'lik açılarla sağ-sol yapılarak Bead'ler yıkandı. Dikkatli bir şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve atıldı.
- Etanol ile yıkama işlemi tekrarlandı. 2. yıkamadan sonra etanolün tamamen uzaklaştırılması için 200 µl'lik pipet ile atıldı, kalan sıvı ise 10 µl'lik pipet ile uzaklaştırıldı ve atıldı.
- DynaMag-2 Magnet üzerindeki tüpler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
- Tüplere 32 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve pipetaj ile homojenize edildi. Ardından tekrar DynaMag-2 Magnet üzerine alındı.
- Süpernatant berraklaştıktan sonra hazır olan kütüphanelerden 28 µl alınarak 0,2 µl'lik temiz bir PCR tüpüne aktarıldı.

Hazırlanan Kütüphanelerin Kantitasyonu

- Hazırlanan kütüphaneler QIAGEN QIAgility cihazında, 1/50'lik, 1/5000'lik ve 1/50.000'lik dilüsyon serileri şeklinde dilüe edildi.
- Ardından QIAseq Library Quant Assay Kit'i ile Rotor Gene Real Time PCR cihazında hazırlanan kütüphanelerin kantitasyon aşaması gerçekleştirildi.
- QIAseq Library Quant Assay Kit'i içerisinde bulunan ILMN DNA standartları soğuk blok üzerinde eritildi.
- ILMN DNA standartları Tablo 12 doğrultusunda 5 seri dilüsyon şeklinde seyreltildi.

Tablo 12. ILMN DNA standartları 5 seri dilüsyon miktarları

Standart	DNA Standart	Dilüsyon Buffer
Std1	5 µl stok standart	45 µl
Std2	5 µl Std1	45 µl
Std3	5 µl Std2	45 µl
Std4	5 µl Std3	45 µl
Std5	5 µl Std4	45 µl

- Örnekler için Tablo 13'te gösterilen şekilde 3 dilüsyon hazırlandı.

Tablo 13. Örnekler için hazırlanacak olan 3 dilüsyon miktarları

Dilüsyon	Kütüphane	Dilüsyon Buffer
Dilüsyon 1 (1:50)	1 µl	49 µl
Dilüsyon 2 (1:5000)	1 µl (1:50)	99 µl
Dilüsyon 3 (1:50000)	1 µl (1:5000)	36 µl

- Real time PCR için mix Tablo 14'e göre hazırlandı. 10-15 saniye santrifüj yapıldı. Soğuk blok üzerindeki PCR tüplerine 17,5 µl Real time PCR mix dağıtıldı ve üzerine 3'er tekrar şeklinde 2,5 µl dilüe edilen standartlardan sıra ile dağıtıldı. 5 standart ve 1 Non Template Control (NTC) için 3 kopya bulunur ve ilk 18 tüp standartlar + NTC oldu.

Tablo 14. SYBR Green PCR içerikleri ve miktarları

İçerik	Hacim
Nükleaz içermeyen su	6,7 µl
SYBR Green ROX FAST Master Mix	10 µl
Primer mix	0,8 µl
Kütüphane DNA	2,5 µl
Toplam	**20 µl**

- Ardından her örneğin 1:5000 ve 1:50000 şeklinde dilüe edilen kütüphaneleri sırasıyla soğuk blok üzerindeki Real Time PCR mix dağıtılan tüplere dağıtıldı.
- Tablo 15'e göre Rotor Gene Real Time PCR cihazı ayarlandı. 30 siklus sonunda floresan ışıma için veri toplandı.

Tablo 15. Rotor gene real time PCR koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
95 °C	10 dakika	1
95 °C	15 saniye	30
68 °C	5 saniye	30
65 °C	5 saniye	30
60 °C	60 saniye	30

- PCR bittikten sonra cihazın "Green" kanalından analiz gerçekleştirildi. Dilüe edilen örneklere ait Ct (Threshold cycle, reaksiyona girdiği döngü) değerleri kaydedildi. Kaydedilen Ct değerleri nanomolar (nM) cinsine dönüştürüldü ve kontrol edildi. İdeal Ct değeri St1 ve St2 değerleriyle paralel olanlardır.

Yeni Nesil Dizileme Cihazına Kütüphanelerin Yüklenmesi

- Ct değerleri St1 ve St2 değerleriyle paralel olan örnekler, ilk olarak 50 nM sonra 4 nM olacak şekilde iki seri dilüsyon yapıldı.
- Dilüe edilen örneklerden her birinden 5 µl alınarak tek bir tüpte toplanarak kütüphane oluşturuldu.
- Kütüphanenin denatürasyonu için yeni 0,2 N sodyum hidroksit (NaOH) hazırlandı. Hazırlanan NaOH'tan 5 µl kütüphaneyi oluşturduğumuz PCR tüpüne pipetaj yapılarak aktarıldı. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 200 mM Tris HCL denatürasyonu sonlandırmak için eklendi.
- Soğuk blok üzerine 3 farklı eppendorf tüp çıkarıldı. 1. eppendorf tüpüne 985 µl hibridizasyon buffer (HT1) eklendi ve içerisine 15 µl örnek (5 µl 4nM kütüphane + 5 µl 0,2 N NaOH + 5 µl 200mM Tris HCL) eklendi ve pipetaj yapıldı. Kütüphane 20 pM olarak hazırlandı. 2. eppendorf tüpe 1203 µl HT1 eklendi. Üzerine 20 pM kütüphaneden 97 µl eklendi ve pipetaj yapıldı. Yeni kütüphane 1,5 pM oldu.
- 3. eppendorf tüpe kütüphanenin yüklenmesi aşamasında referans okuması için 1994 µl HT1 ve 6 µl 100 µM Read 1 primer eklendi ve pipetaj yapıldı. NextSeq kartuşunda 7. pozisyondaki kuyucuğa bu tüpteki tüm hacim aktarıldı.
- 2. eppendorf tüp içerisinde bulunan 1,5 pM olarak hazırlanan örneğin tüm hacmi NextSeq kartuşunda 10. pozisyondaki kuyucuğa yüklendi.

- NextSeq550 cihazına (Şekil 4), NextSeq Flowcell, NextSeq kartuşu, NextSeq buffer kartuşu (Şekil 5) ve atık kutusu yerleştirilerek dizileme işlemi başlatıldı.



Şekil 4. NextSeq 550 cihazı (200)



Şekil 5. NextSeq flowcell, NextSeq kartuşu ve NextSeq buffer kartuşu (201)

Verilerin Biyoinformatik Analizi

NextSeq550 cihazının yaptığı okumanın ardından ilgili genlerin hedeflenmiş dizilerini ve kalite skorlarını içeren ham veriler FastQ dosyasında depolandı. Bu dosyalar analiz yapılması için hazır olan human genome (hg19) referans dizilerine hizalanarak bam dosyaları oluşturuldu. Bam dosyaları verilerin biyoinformatik analizi için Qiagen Ingenuity Variant Analysis (IVA) ve Qiagen Clinical Insight (QCI) çevrimiçi yazılımlarına yüklendi. Verilerin görsel açıdan detaylı incelenmesi için de hedeflenen ilgili genlerin nükleotid dizilerini görselleştiren IGV (Integrative Genomics Viewer- Broad Institute) programı kullanıldı. Varyantların filtrelenmesinde ExAC, Genom Toplama Veritabanı (gnomAD) ve Tek Nükleotid Polimorfizm Veritabanı (dbSNP) açık veri tabanlarında ve IJE insidansı göz önünde bulundurularak minör allele sıklığı

(MAF) %1'in üstünde olan varyantların filtrelenmesi yapıldı. Saptanan varyantların endikasyon ile ilişkili olup olmadığını (patojenitesi) ACMG-2015 (American College of Medical Genetics and Genomics-2015) kriterlerine göre değerlendiren belirli çevrimiçi veri tabanları kullanıldı: HGMD (Human Genom Mutation Database), NCBI (National Center for Biotechnology Information), dbSNP, VarSome (The Human Genomics Community) ve Franklin by Genoox. İnsiliko analizleri için MutationTaster, PolyPhen (Polymorphism Phenotyping v2), SHIFT (Sorting Intolerant From Tolerant), DANN skoru (Patojenite skorlama methodolojisi) ve CADD Skoru (Combined Annotation Dependent Depletion) değerleri dikkate alındı. İnsanda Çevrimiçi Mendel Kalıtımı (OMIM) veri tabanında fenotip ile ilişkisi değerlendirildi.

ACMG-2015 Skorlama Kriterleri

Patojenik kriterler:

1) Çok güçlü patojenite kanıtı:
   PVS1: Fonksiyon kaybının bilinen bir hastalık sebebi olduğu durumlarda anlamsız, çerçeve kayması mutasyonları, başlama kodonu ya da birçok ekzonun delesyonudur.
2) Patojenik etkinin güçlü kanıtları:
   PS3: Varyantın zararlı etkisi in vivo ve in vitro çalışmalarla desteklenmekte.
   PS4: Varyantın etkilenen bireylerde prevelansının anlamlı derecede artması.
3) Patojenik etkinin orta dereceli kanıtları:
   PM1: Benign varyasyonların görülmediği hot-spot (mutasyonların fazla gerçekleştiği sıcak bölgeler) noktalar ve kritik fonksiyonel alanlarda bulunması
   PM2: Ekzon Sekans Projesi, 1000 Genom veya ExAC gibi konsorsiyumlarda düşük alel frekansı.
   PM3: Çekinik hastalıklar için başka bir patojenik varyantla trans halinde tespit edilen varyant.
   PM4: Protein uzunluğunun çerçeve içi delesyon ya da insersiyon ile kısalması.
   PM5: Daha önce patojenik olduğu belirlenen bir missense varyasyonun olduğu amino asitte olan yeni (novel) bir missense varyant.
4) Patojeniteyi destekleyen kanıtlar:
   PP1: Hastalığa neden olduğu kesin olarak bilinen bir gende, etkilenen birden fazla aile üyesinde hastalık ile birlikte ayrışma.
   PP2: Benign yanlış anlamlı varyasyon görülme sıklığının düşük olduğu bir gende saptanan yanlış anlamlı varyant.

PP3: Birden fazla biyoinformatik algoritma tarafından gen veya gen ürünü üzerinde bulunan varyantın patojenitesini destekleyen.

PP5: Güvenilir kaynaklar tarafından yakın zamanda patojenik olarak bildirilen fakat ancak laboratuvarın bağımsız bir değerlendirme yapabilmesi için kanıt yoktur.

Benign kriterleri:

1) Benign etkinin güçlü kanıtı:

   BS1: Hastalık için öngörülenden yüksek alel frekansı.

   BS2: Erken yaşta tam penetrasyon beklenen ve sağlıklı bir erişkin bireyde resesif (homozigot), dominant (heterozigot) veya X'e bağlı (hemizigot) olarak gözlenebilen hastalık durumu.

   BS3: İn vivo ve in vitro çalışmalarla protein fonksiyonu ve splaysta zararlı etkisinin gözlemlenememesi.

   BS4: Bir ailenin etkilenen üyelerinde segregasyon eksikliği.

2) Benign etkiyi destekleyen kanıtlar:

   BP2: Tamamen penetran dominant bir gen/hastalık için patojenik başka bir varyantla trans halinde ya da herhangi bir kalıtım modelinde patojenik başka bir varyantla cis halinde gözlemlenmesi.

   BP4: Çok sayıda biyoinformatik algoritma tarafından, gen veya gen ürünü üzerinde bir etkisi olmadığını göstermesi benign varyant.

   BP6: Güvenilir kaynaklar tarafından son zamanlarda benign olarak bildirilen, ancak bulguların bir laboratuvar tarafından bağımsız bir değerlendirme yapmak için uygun olmamasıdır.

   Yalnız kalan kriterler:

   PA2: Varolan ortak patojenik kurucu mutasyon (202).

Saptanan Varyantların Sanger Sekans Yöntemi ile Doğrulanması

Yapılan çalışma sonrasında klinik önemi bilinmeyen (VUS), olası patojenik ve patojenik olarak saptanan varyantların doğrulaması ve kalıtım şekilleri belirlendi. İlgili gen bölgelerine özgü sentetik oligonükleotidler tasarlandı. Bu primerlerin tasarım aşamasında Ensemble veri tabanı, FastPCR (PrimerDigital Ltd, Finland) ve PerlPrimer (owenjm) programları kullanıldı.

Hastanın hayatta ise her iki ebeveyninden ve varsa kardeş veya kardeşlerinin periferik kan örneklerinden gDNA'lar elde edildi. İlgili gen bölgeleri için tasarlanan primerler kullanılarak uygun koşullarda PCR ile amplifiye edildi. Amplifiye olan amplikonlar %2'lik agoroz

jelde yürütülerek değerlendirildi. Pürifikasyon aşaması için PCR amplikonları ExoSap-IT (ThermoFischer Scientific, ABD) kullanıldı. Ardından forward ve reverse nükleotidlerin belirlenmek için Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (ThermoFischer Scientific, ABD) kullanılarak sekans PCR'ları yapıldı. Tekrar yapılacak olan pürifikasyon aşaması için sefadex ve spin kolonları kullanıldı (Merck KgaA, Darmstadt, Germany). Saflaştırılan örnekler Applied Biosystems ABI 3130XL (ThermoFischer Scientific, ABD) sekans cihazında dizilendi. Cihazda elde edilen diziler Chromas ve BioEdit yazılım programlarında görüntülenerek analiz yapıldı.

BULGULAR

Çalışmaya NOA tanısı alan, karyotipi normal ve Y mikrodelesyonu saptanmayan toplamda 40 hasta dahil edildi. Hastaların yaşları 22 ile 43 arasında değişiklik göstermekteydi. Yaş ortalaması 32 olarak saptandı. Hasta grubundaki kişilere ilişkin yaş ve cinsiyet dağılımı Tablo 16'da yer almaktadır. NOA ve genetik etiyolojisi hakkında bilgi verebilecek ilgili literatürlerin ve veri tabanlarının taraması yapıldı. Yapılan bu taramalar sonucunda, NOA ile ilişkili olduğu ve olabileceği düşünülen 21 gen çalışmaya dahil edildi. Bu genler *TERB1, MAJIN, MTRR, PIWIL1, SOX10, SIRPG, SIRPA, DNAH6, MEI1, DNAH17, ZMYND15, DNAH1, DPY19L2, SEPTIN12, KLHL10, DDX25, LHB, CATSPER1, NPHP4, CFTR* ve *FKBPL* genleridir.

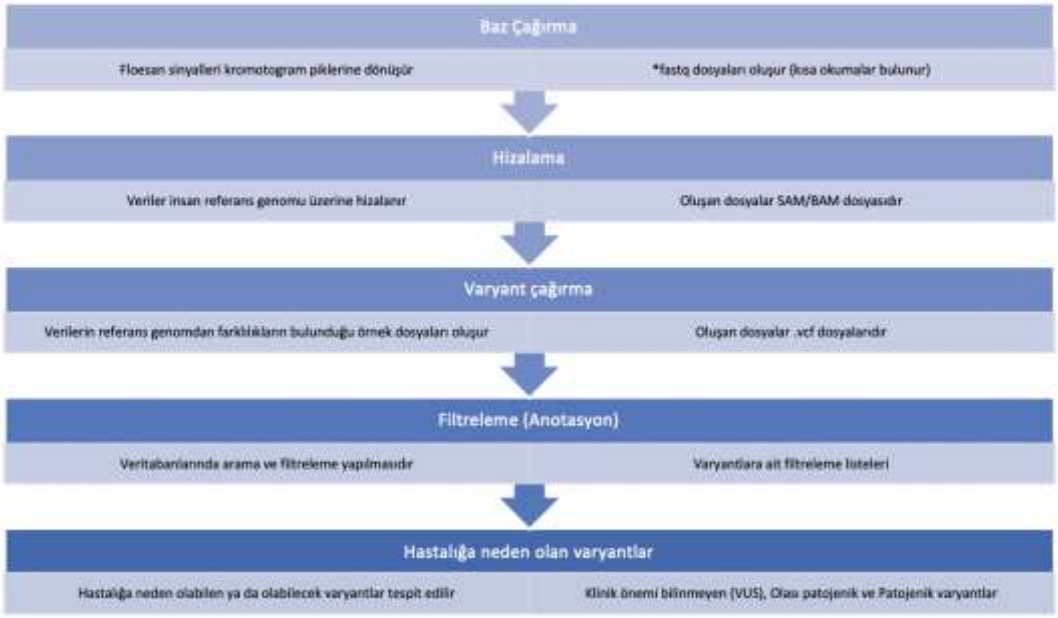
Tablo 16. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ve cinsiyet bilgileri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet
INF1	30	E
INF2	32	E
INF3	27	E
INF4	22	E
INF5	30	E
INF6	30	E
INF7	34	E
INF8	29	E
INF9	29	E
INF10	31	E
INF11	32	E
INF12	33	E
INF13	38	E
INF14	29	E
INF15	28	E
INF16	30	E
INF17	32	E
INF18	43	E
INF19	32	E
INF20	33	E
INF21	30	E
INF22	29	E
INF23	32	E
INF24	40	E
INF25	30	E
INF26	31	E
INF27	33	E
INF28	27	E
INF29	27	E
INF30	42	E
INF31	28	E
INF32	39	E
INF33	40	E
INF34	27	E
INF35	33	E
INF36	24	E
INF37	33	E
INF38	41	E
INF39	38	E
INF40	32	E

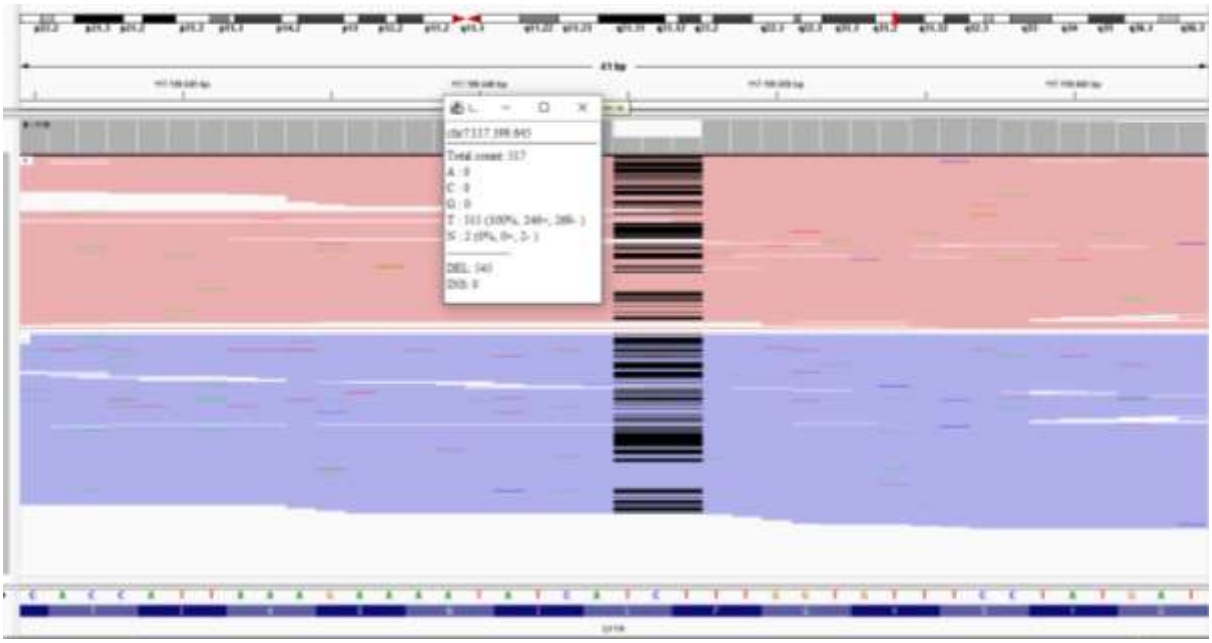
Çalışmada 40 hastaya ait gDNA örneklerinden hedeflenmiş NGS ile toplam 21 gene ait kodlama yapan ve ekzon/intron splicing bölgelerine özgü sekanslama işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen veriler doğrultusunda kodlama yapan ve ekzon/intron splicing bölgeleri değerlendirildiğinde ≥ 98 oranında kaplam yüzdesi elde edildi. Hedef genlerin UMI indeks kaplamı ≥ 10x ≥ %95 ve ≥ 30x'te ≥ %90 olarak gözlendi. Saptanan nükleotid değişimleri açısından NGS verileri değerlendirilirken okuma derinliği en az 30 olarak kabul edildi.

Çalışılan tüm hastalara ait örneklerin kalite ölçüt parametreleri kontrol edildi. Parametrelerin yeterli ve uygun olduğu gözlendikten sonra elde edilen verilerin biyoinformatik analiz akışı Şekil 6'da verilmiştir. Analiz sonucu benign ve olası benign olarak saptanan varyantlar değerlendirilmedi. Çalışmaya dahil edilen 40 hastanın 17'sinde 13 farklı gende 24 varyant saptandı. ACMG-2015 kriterlerine göre 6'sı patojenik, 5'i olası patojenik ve 18'i klinik önemi

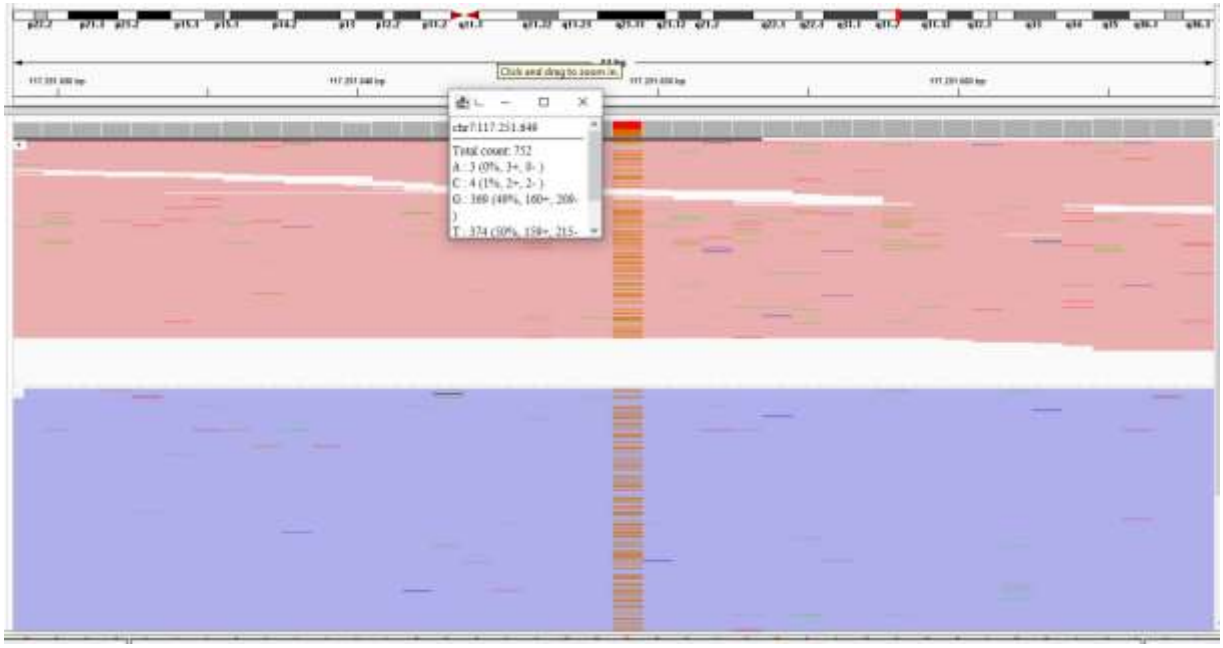
belirsiz (VUS) varyant saptandı. 2 gende (*DPY19L2* ve *KLHL10*) yeni varyant saptandı. Hastalarda bulunan olası patojenik ve patojenik varyantların IGV görüntüleri Şekil 7-17'de verilmiştir. VUS, olası patojenik ve patojen varyantların saptandığı hastaların analiz sonuçları, Tablo 17'de genotipleri, patojeniteleri, ACMG-2015 skorları, ClinVar, dbSNP, OMIM fenotip uyumu verilmiştir. Tablo 18'de da ise varyantlara ait genotip ve in-siliko tahmin skorları (PolyPhen, SHIFT, DANN skoru ve CADD Skoru) verilmiştir. VUS, olası patojenik ve patojenik varyant tespit ettiğimiz hastaların segregasyon analizleri devam etmektedir.



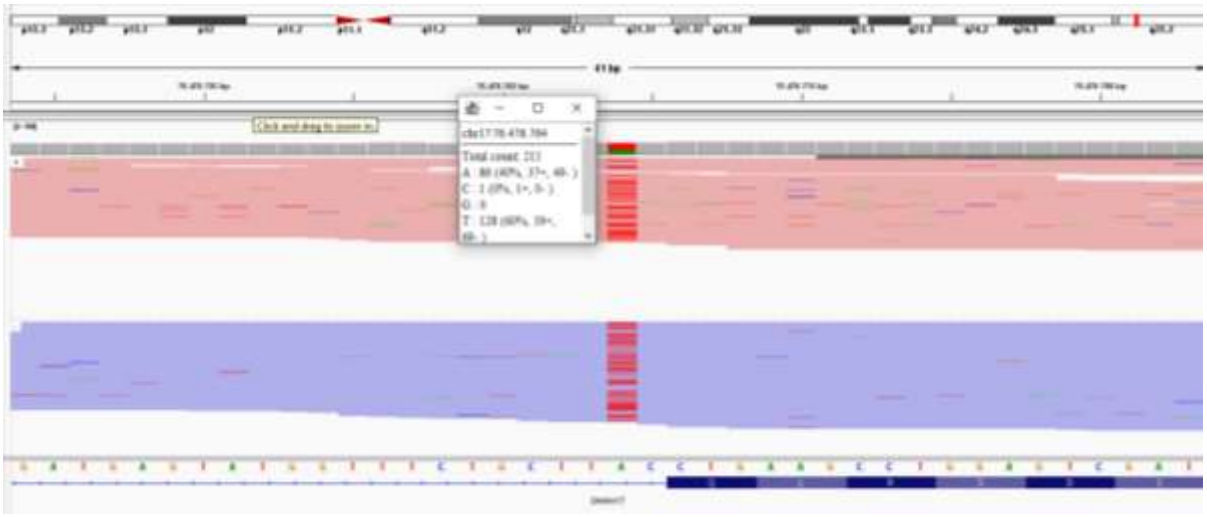
Şekil 6. Verilerin biyoinformatik analiz akışı



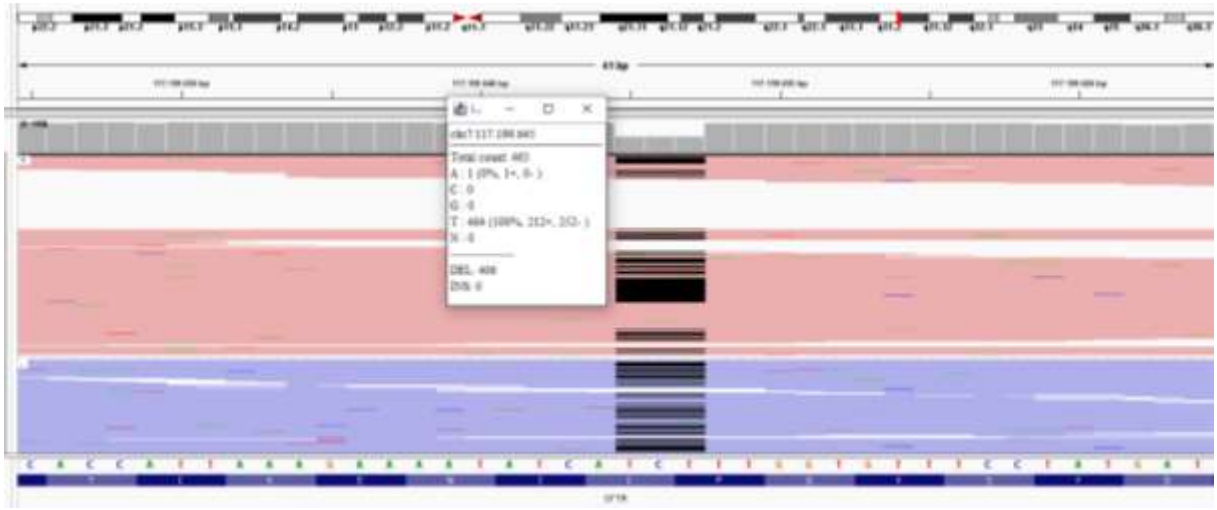
Şekil 7. INF4 hastasının patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000492.4(CFTR):c.1521_1523del (p.Phe508del)



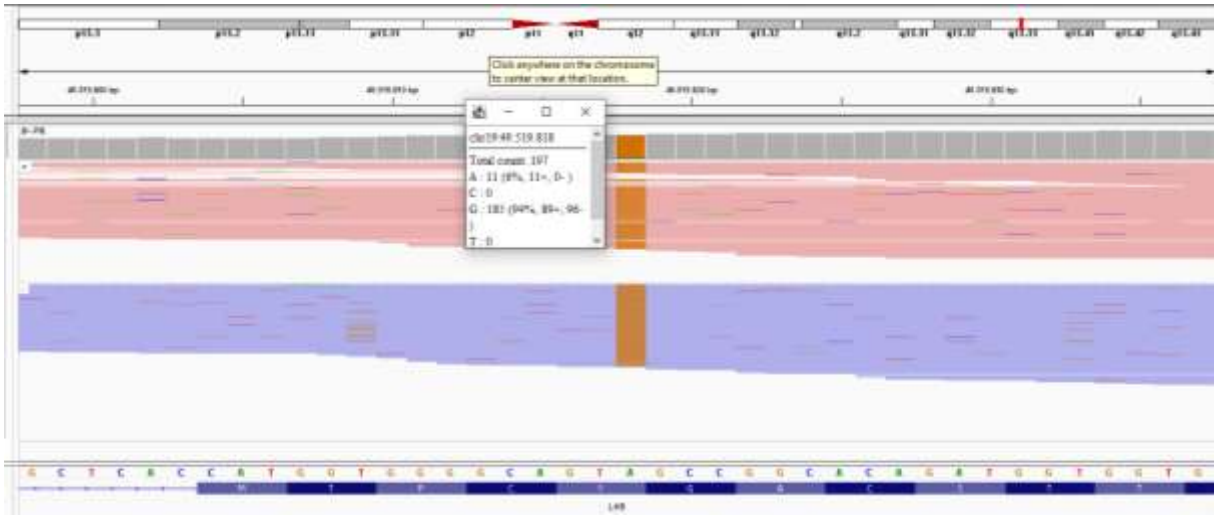
Şekil 8. INF8 hastasının patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000492.4(CFTR):c.3154T>G (p.Phe1052Val)



Şekil 9. INF19 hastasının olası patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_173628.4(DNAH17):c.7752+2T>A



Şekil 10. INF21 hastasının patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000492.4(CFTR):c.1521_1523delCTT (p.F508del)



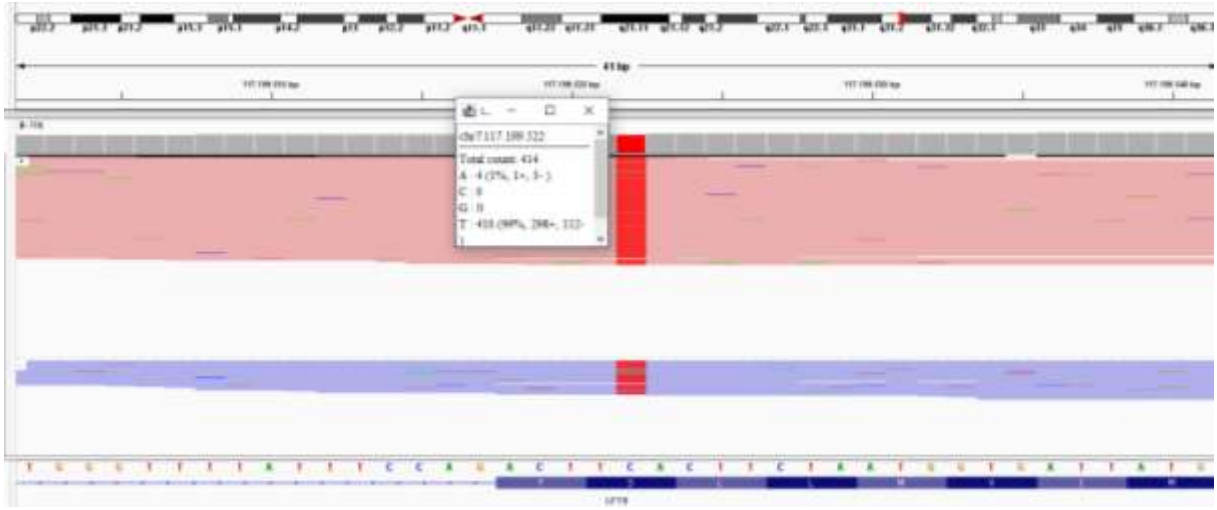
Şekil 11. INF22 hastasının olası patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000894.3(LHB):c.169T>C (p.Tyr57His)



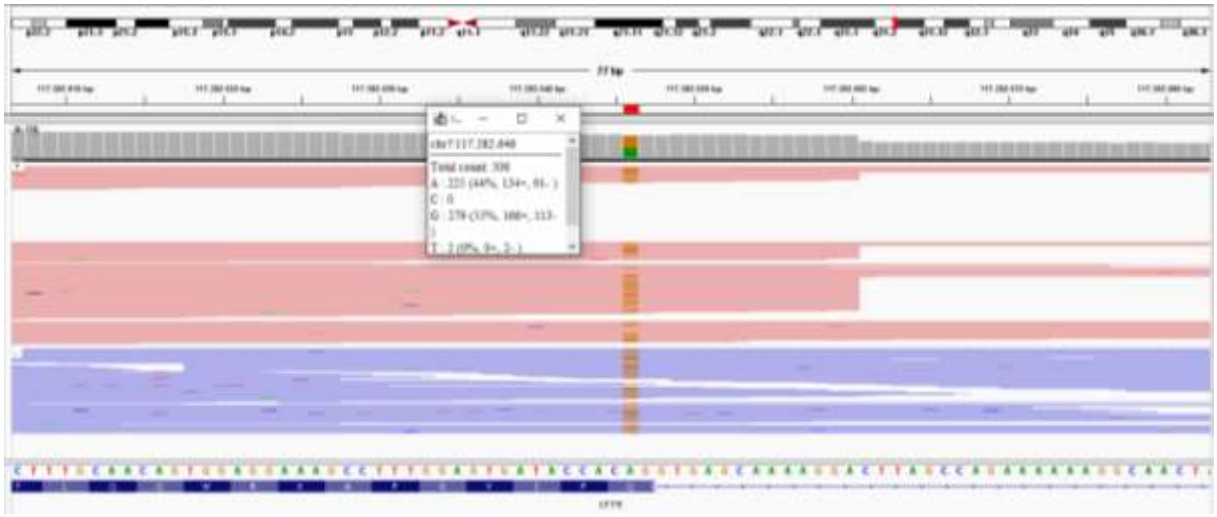
Şekil 12. INF23 hastasının olası patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000894.3(LHB):c.169T>C (p.Tyr57His)



Şekil 13. INF28 hastasının patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000492.4(CFTR):c.350G>A (p.R117H)



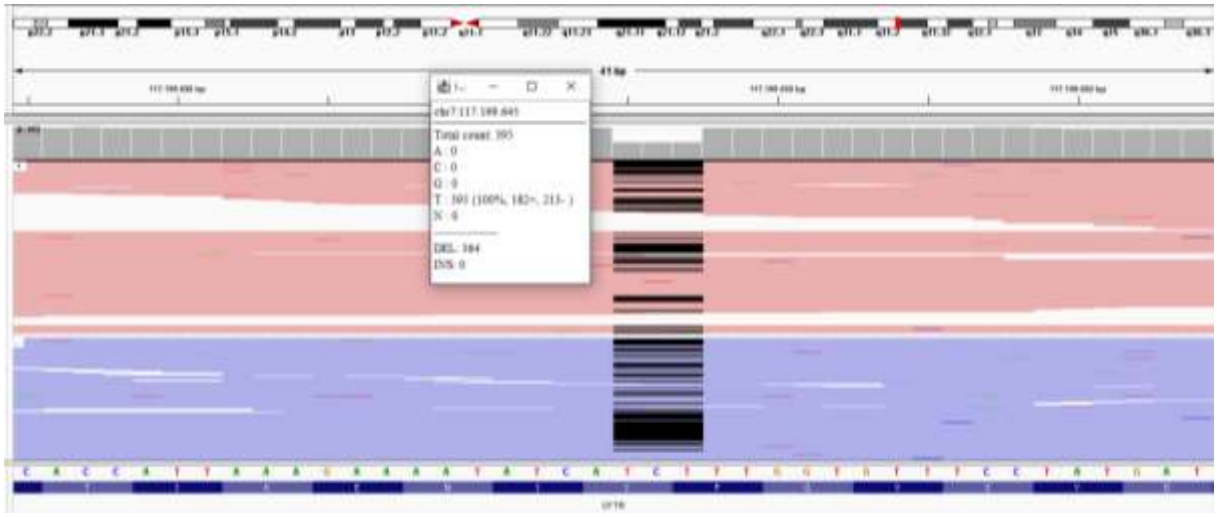
Şekil 14. INF29 hastasının patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000492.4(CFTR):c.1397C>T (p.S466L)



Şekil 15. INF33 hastasının olası patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000492.4(CFTR):c.3872A>G (p.Q1291R)



Şekil 16. INF37 hastasının olası patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_173812.5(DPY19L2):c.247C>T (p.Q83*)



Şekil 17. INF37 hastasının patojenik varyantının IGV görüntüsü-NM_000492.4(CFTR):c.1521_1523delCTT (p.F508del

Tablo 17. VUS, olası patojenik ve patojenik varyantların saptandığı hastaların analiz sonuçları, genotipleri, patojeniteleri, ACMG-2015 skorları, ClinVar, dbSNP, OMIM fenotip uyumu

Hasta No	Analiz Sonucu	Genotip	Patojenite	ACMG-2015	ClinVar	dbSNP	OMIM-Fenotip
INF1	NM_173628.4(DNAH17):c.12915+10G>A	Heterozigot	VUS	BP4	—	rs370237603	618643
INF3	NM_032265.2(ZMYND15):c.1898G>A p.(Arg633His)	Heterozigot	VUS	PP2, PP3	Çelişkili	rs148980412	615842
INF4	**NM_000492.4(CFTR):c.1521_1523del (p.Phe508del)** NM_015512.5(DNAH1):c.10216G>A (p.Val3406Ile) NM_015102.5(NPHP4):c.3574C>T (p.Arg1192Trp)	**Heterozigot** Heterozigot Heterozigot	**Patojenik** VUS VUS	**PM1, PM2, PM4, PS3, PP3, PP5** PP3 PP3, PM2, BS2	**Patojenik** Muhtemel benign Muhtemel benign	**rs113993960** rs201752275 rs139022622	**—** 617576 —
INF8	**NM_000492.4(CFTR):c.3154T>G (p.Phe1052Val)**	Heterozigot	**Patojenik**	**PM1, PM2, PM3, PP3, BS2**	**İlaç yanıtı**	**rs150212784**	**—**
INF10	NM_000492.4(CFTR):c.890G>A (p.Arg297Gln) NM_173812.5(DPY19L2):c.2221C>A (p.P741T)	Heterozigot Heterozigot	VUS VUS	PS3, PM1, PP3, BS3, BP6 PM2, PP3	Çelişkili —	rs14348692 rs753909113	— 613958
INF11	NM_015512.5(DNAH1):c.9495G>A (p.Thr3165) NM_144605.5(SEPTIN12):c.611G>T (p.Arg204Leu) NM_152467.5(KLHL10):c.1226A>G (p.E409G)	Heterozigot Heterozigot Heterozigot	VUS VUS VUS	PM2, PP3 PP3 PM2, PP3	— — —	rs754194652 rs140969211 —	617576 614822 615081
INF13	NM_000492.4(CFTR):c.3256A>G (p.Thr1086Ala)	Heterozigot	VUS	PM1, PM2, PP3	VUS	rs373043500	—
INF15	NM_001330438.2(DDX25):c.110C>T (p.Ala37Val)	Heterozigot	VUS	PP3	—	rs762895726	—
INF16	NM_015512.5(DNAH1):c.4642C>G (p.L1548V) NM_053054.4(CATSPER1):c.2064+6G>A	Heterozigot Heterozigot	VUS VUS	PM2, PP3 PP3	— VUS	— rs143930161	617576 612997
INF19	**NM_173628.4(DNAH17):c.7752+2T>A**	**Heterozigot**	**Olası patojenik**	**PVS1**	—	**rs201018927**	**618643**
INF21	**NM_000492.4 (CFTR):c.1521_1523delCTT (p.F508del)**	**Heterozigot**	**Patojenik**	**PA2, PS3, PS4, PM1, PM3, PM4, PP3, PP5, BS1, BS2, BS3, BS4, BP2**	**Patojenik**	**rs113993960**	—
INF22	**NM_000894.3(LHB):c.169T>C (p.Tyr57His)** NM_001370.2(DNAH6):c.12047T>G p.Leu4016Arg) NM_022110.4(FKBPL):c.229_240dup p.(Ser77_Ser80dup)	**Homozigot** Heterozigot Heterozigot	**Olası patojenik** VUS VUS	**PM2, PP3, PS4** PP3 PM4, BS1	— — —	**rs371722800** rs1441141120 rs373328430	— — —
INF23	**NM_000894.3 (LHB):c.169T>C (p.Tyr57His)**	**Homozigot**	**Olası patojenik**	**PM2, PP3, PS4**	**—**	**rs371722800**	**—**
INF28	**NM_000492.4(CFTR): c.350G>A (p.R117H)**	**Heterozigot**	**Patojenik**	**PA2, PS3, PM1, PM2, PM3, PM5, PP1, PP3, PP5, BS2, BS4, BP2**	**Patojenik**	**rs78655421**	**—**
INF29	**NM_000492.4(CFTR):c.1397C>T (p.S466L)** NM_144605.5(SEPTIN12):c.208T>C (p.Phe70Leu)	**Homozigot** Heterozigot	**Patojenik** VUS	**PM1, PM2, PP3** PM2, PP3	**Olası Pato-jenik** —	**rs121908805** rs1298628849	**—** 614822
INF33	**NM_000492.4(CFTR):c.3872A>G (p.Q1291R)**	**Heterozigot**	**Olası patojenik**	**PM1, PM2, PM3, PP3**	**Çelişkili**	**rs397508621**	—
INF37	**NM_173812.5(DPY19L2): c.247C>T (p.Q83*)** **NM_000492.4(CFTR):c.1521_1523delCTT (p.F508del)**	**Heterozigot** **Heterozigot**	**Olası patojenik** **Patojenik**	**PVS1, PM2** **PA2, PS3, PS4, PM1, PM3, PM4, PP3, PP5, BS1, BS2, BS3, BS4, BP2**	**—** **Patojenik**	— **rs113993960**	**613958** **—**

Tablo 18. Varyantlara ait genotip ve in sliko tahmin skorları (PolyPhen, SHIFT, DANN skoru ve CADD Skoru)

Hasta No	Gen	Kalıtım	Transkript	HGVSc	HGVSp	SIFT	PolyPhen	CADD	DANN
INF1	*DNAH17*	—	NM_173628.4	c.12915+10G>A	—	—	—	<10 (olası olmayan zararlı)	0.5891
INF3	*ZMYND15*	—	NM_032265.2	c.1898G>A	p.(Arg633His)	—	Olası zararlı	31 (zararlı)	0.9996
INF4	*CFTR* *DNAH1* *NPHP4*	Resesif — Resesif	NM_000492.4 NM_015512.5 NM_015102.5	c.1521_1523del c.10216G>A c.3574C>T	p.(Phe508del) p.(Val3406Ile) p.(Arg1192Trp)	— Tolere Zararlı	— Muhtemelen zararlı Olası zararlı	21.2 (zararlı) 24.4 (zararlı) 23.3 (zararlı)	— 0.9977 0.9981
INF8	*CFTR*	Resesif	NM_000492.4	c.3154T>G	p.(Phe1052Val)	—	Olası zararlı	29.7 (zararlı)	0.9935
INF10	*CFTR* *DPY19L2*	— Resesif	NM_000492.4 NM_173812.5	c.890G>A c.2221C>A	p.(Arg297Gln) p.(P741T)	— Zararlı	Benign Muhtemelen zararlı	24.8 (zararlı) 22.4 (zararlı)	0.9989 0.9969
INF11	*DNAH1* *SEPTIN12* *KLHL10*	— Dominant Dominant	NM_015512.5 NM_144605.5 NM_152467.5	c.9495G>A c.611G>T c.1226A>G	p.(Thr3165) p.(Arg204Leu) p.(E409G)	— Tolere Tolere	— Olası zararlı Muhtemelen zararlı	20.5 (zararlı) 25.4 (zararlı) 24.8 (zararlı)	0.7718 0.9965 0.998
INF13	*CFTR*	—	NM_000492.4	c.3256A>G	p.(Thr1086Ala)	—	Olası zararlı	24.4 (zararlı)	0.9985
INF15	*DDX25*	—	NM_001330438.2	c.110C>T	p.(Ala37Val)	Zararlı	Olası zararlı	27.9 (zararlı)	0.9143
INF16	*DNAH1* *CATSPER1*	— —	NM_015512.5 NM_053054.4	c.4642C>G c.2064+6G>A	p.(L1548V) —	Zararlı —	Olası zararlı —	25.7 (zararlı) <10 (olası zararlı)	0.9985 0.7733
INF19	*DNAH17*	—	NM_173628.4	c.7752+2T>A	—	—	—	33 (zararlı)	0.9816
INF21	*CFTR*	Resesif	NM_000492.4	c.1521_1523delCTT	p.(F508del)	—	—	21.2 (zararlı)	—
INF22	*LHB* *DNAH6* *FKBPL*	Resesif — —	NM_000894.3 NM_001370.2 NM_022110.4	c.169T>C c.12047T>G c.229_240dup	p.(Tyr57His) p.(Leu4016Arg) p.(Ser77_Ser80dup)	Tolere — —	Olası zararlı Olası zararlı —	23 (zararlı) 27.7 (zararlı) 16.35 (muhtemelen zararlı)	0.9895 0.9982 —
INF23	*LHB*	Resesif	NM_000894.3	c.169T>C	p.(Tyr57His)	Tolere	Olası zararlı	23 (zararlı)	0.9895
INF28	*CFTR*	Resesif	NM_000492.4	c.350G>A	p.(R117H)	—	Olası zararlı	25.6 (zararlı)	0.9992
INF29	*CFTR* *SEPTIN12*	Resesif Dominant	NM_000492.4 NM_144605.5	c.1397C>T c.208T>C	p.(S466L) p.(Phe70Leu)	— Zararlı	Olası zararlı Olası zararlı	31 (zararlı) 27.3 (zararlı)	0.9959 0.9989
INF33	*CFTR*	Resesif	NM_000492.3	c.3872A>G	p.(Q1291R)	Zararlı	Benign	25.6 (zararlı)	0.9964
INF37	*DPY19L2* *CFTR*	Resesif Resesif	NM_173812.5 NM_000492.4	c.247C>T c.1521_1523delCTT	p.(Q83*) p.(F508del)	— —	— —	34 (zararlı) 21.2 (zararlı)	0.9834 —

TARTIŞMA

Günümüzde hem anne adayının gebe kalma yaşının ileri olması hem de baba adayının sperm kalitesinin düşmesi ile birlikte üreme sistemi bozukluklarında önemli ölçüde artış gözlenmektedir. İnfertilite de dünya çapında artış gösteren bir erkek veya kadın üreme sistemi hastalığıdır. WHO'ya göre infertilite, 12 ay veya daha uzun süre düzenli ve korunmasız cinsel ilişki sonrasında gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır. İnfertilite vakaları ile ilgili veriler yeterli miktarda olmasa da dünya çapında ki çiftlerin %10-15'inde infertilite görülmektedir (1,2). İnfertilite vakalarının %50'si erkek faktörlerinden oluşur (203).

Erkek infertilitesi kompleks, heterojen ve multifaktöriyel bir patolojik durumdur. Vakalarının %50'sinden fazlası idiyopatiktir ve infertilite vakalarının yaklaşık %10'u tıbbi olarak açıklanamamaktadır (15). Etiyolojisinde epigenetik, genetik ve genetik olmayan birçok faktör önemli bir role sahiptir. Spermatojenik hata (SPGF) genetik nedenler arasında yer alır ve oligozoospermiden kriptozoospermiye ve azospermiye kadar uzanan geniş bir fenotipik spektrumda kendini gösterir (203).

İnfertil erkeklerin %10-15'inde ise azospermi görülmektedir. Yani ejekülatta sperm gözlenmemektedir. Erkek popülasyonun yaklaşık %1'ini temsil etmektedir (43,46). Azospermi, OA ve NOA olarak 2 alt gruba ayrılmaktadır. NOA, spermatogenezde oluşabilecek hatalardan kaynaklanmaktadır (pretestiküler veya testiküler) (13,45). Azospermik hastaların yaklaşık %20'sinde genetik bir neden tespit edilebilir. Bu nedenler arasında kromozom anomalileri (Klinefelter sendromu (47, XXY) gibi) ve Y kromozomunun AZF bölgesinde mikrodelesyonlar yer alır. Ancak nedenlerin büyük çoğunluğu açıklanamamıştır (203).

Çalışmamızda NOA tanısı alan, karyotipi normal ve Y mikrodelesyonu saptanmayan hastalarda genetik etiyolojinin aydınlatılması amacıyla, NOA ile ilişkili olduğu ve olabileceği

düşünülen 21 genin (*TERB1, MAJIN, MTRR, PIWIL1, SOX10, SIRPG, SIRPA, DNAH6, MEI1, DNAH17, ZMYND15, DNAH1, DPY19L2, SEPTIN12, KLHL10, DDX25, LHB, CATSPER1, NPHP4, CFTR ve FKBPL*) NGS yöntemi kullanılarak analizi gerçekleştirildi.

Çalışmamıza dahil edilen 40 hastanın 6'sında patojenik (4 tane *CFTR* geninde), 5'inde olası patojenik (*DNAH17, CFTR, DPY19L2* ve *LHB* genlerinde) ve 10'unda VUS (3 tane *DNAH1* geninde, 2 tane *CFTR* geninde, 2 tane *SEPTIN12* geninde, *DNAH17, ZMYND15, NPHP4, DPY19L2, KLHL10, DDX25, CATSPER1, DNAH6* ve *FKBPL* genlerinde) olmak üzere toplam olarak 17 hastada 24 varyant saptadık.

Li, L. ve ark.'ları (90) 35 yaşında infertil bir erkek hastada tam ekzom dizileme (WES) analizi ile *DNAH6* geni içindeki bileşik heterozigot varyantları (c.2454A>T; p.E818D ve c.7706G>A; p.R2569H) tanımlamışlardır. Çalışmanın sonucunda *DNAH6* geninde meydana gelebilecek varyantlar globozoospermi ile ilişkilendirmişlerdir. Gershoni, M. ve ark.'ları (92) yaptıkları çalışmada, ailesel NOA ve testiküler spermatosit olgunlaşma durması olan birbirleriyle aile bağları olmayan ama kendi aralarında aile bağları olan 3 aile incelenmiştir. Çalışmada NGS tekniği kullanılmıştır. NOA'lı erkeklerde daha önce bildirilmeyen 3 yeni (novel) varyant tespit edilmiştir. 3 aileden 1'inde *DNAH6*:c.C10413A (p.H3471Q) (NM_001370) varyantı homozigot olarak tespit edilmiştir. Böylece *DNAH6* geni azosperminin olası nedenleri arasında değerlendirmişlerdir.

INF22 numaralı hastamızda *DNAH6* geninde saptadığımız heterozigot, *DNAH6*:c.12047T>G (p.Leu4016Arg) varyantın global alel frekansı 0.000013 (2/156524 GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli bildirilmemiştir. 187 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın *DNAH6* geninin bir allelini (heterozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi görülemesi beklenmese de veri tabanlarında kalıtım şeklinin belirtilmemesinden dolayı varyantın göz ardı edilmemesi gerektiğini düşünmekteyiz.

DNAH17 geni, OMIM'de Spermatojenik Hata 39 (SPGF39) (OMIM*618643) ile genfenotip ilişkisi göstermiştir. Otozomal resesif (AR) kalıtım göstermektedir. SPGF39, internal genitalyada fenotipik etkileri görülebilir. Fenotipik etkilerden bazıları infertilite, sperm miktarının azalması (bazı hastalarda), total hareketliliğin azalmasıdır (102). Sha, Y. ve ark.'larının (107) yaptığı çalışmada, 34 yaşındaki şiddetli astenozoospermi ve MMAF erkek hastada *DNAH17* geninde bi-allelik varyantlar (c.C4445T (p.A1482V) ve c.C6857T (p.S2286L)) tespit edilmiştir. Biallelik varyantların *DNAH17* ekspresyonunu azalttığı, ODA ve sperm fonksiyonu üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabileceğini, bu sayede şiddetli astenozoospermi ve MMAF

fenotipinin ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Sakar, S. ve ark.'larının (204) yaptığı çalışmada azospermik ve oligozoospermik infertil hastalar (6 kişi), oligo/astenozoospermik infertil erkekler (11 kişi), normozoospermik fertil kontroller (6 kişi) ve ve normozoospermik fertil kontroller (10 kişi) üzerinde metilasyon analizi yapılmıştır. *DNAH17* geninin spermatogenezde rol oynadığı ve sperm flagellası üzerindeki etkileriyle sperm motilitesi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

INF1 numaralı hastamızda *DNAH17* geninde saptadığımız heterozigot, *DNAH17*:c.12915+10G>A varyantın global alel frekansı 0.0000486 (11/226436 GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli bildirilmemiştir. 201 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın *DNAH17* geninin bir allelini (heterozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi görülmesi beklenmese de veri tabanlarında kalıtım şeklinin belirtilmemesinden dolayı varyantın göz ardı edilmemesi gerektiğini düşünmekteyiz.

INF19 numaralı hastamızda *DNAH17* geninde saptadığımız heterozigot, *DNAH17*:c.7752+2T>A varyantın global alel frekansı 0.000177 (44/248168 GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli bildirilmemiştir. 111 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "Olası Patojenik" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın *DNAH17* geninin bir allelini (heterozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi görülmesi beklenmese de veri tabanlarında kalıtım şeklinin belirtilmemesinden dolayı varyantın göz ardı edilmemesi gerektiğini düşünmekteyiz.

ZMYND15, histon deasetilaz enzimlerinin (HDAC) alınması yoluyla bir transkripsiyon baskılayıcıdır (111). Testislerde yüksek oranda eksprese edilir (112). *ZMYND15* geni OMIM'de Spermatojenik Hata 14 (SPGF14) (OMIM*615842) ile gen-fenotip ilişkisi göstermiştir. AR kalıtım göstermektedir. SPGF14, internal genitalyada fenotipik etkileri görülebilir. Bu etkiler azospermi, spermatid evresinde maturasyon durması ve tübüler membranın kalınlaşmasıdır (109). Yan, W. ve ark'larının (111) yaptığı fare modelleme çalışmasında, *ZMYND15* geninin ilk spermatid spesifik transkripsiyon baskılayıcı olduğu ve spermiyogenezde yüksek oranda eksprese edilen testise özgü bir gen olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışma doğrultusunda *ZMYND15* inaktif erkek farelerde spermiyojenik hataya neden olduğu ve bundan dolayı tam erkek infertilitesi ve azospermi görülmüştür. Aynı zamanda insan *ZMYND15* geninin fare *ZMYND15* geni ile yüksek derecede homoloji gösterdiğinden, sadece testiste eksprese edildiğinden dolayı insanlarda da benzer fizyolojik rollere sahip olduğu düşünülmektedir. Ayhan, Ö. ve ark'larının (205) idiyopatik azospermisi olan birbirlerinden bağımsız ama kendi içlerinde

akraba olan 2 aile üzerinde yaptığı çalışmada ailelerin birinde 3 azospermik erkek kardeşte homozigot, *ZMYND15*:c.1520_1523delAACA (p.K507Sfs*3) varyantı tespit edilmiştir. Fertil olduğu düşünülen erkek kardeşin heterozigot olduğu bildirilmiştir. Varyant, ekzon 9 'da transkripsiyonel okuma çerçevesini değiştirdiği ve genin doğrulanmış 3 protein izoformunda iki doğal-olmayan aminoasidin sentezinden sonra erken terminasyona neden olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, *ZMYND15* geninin spermatogenez hatalarından (yetmezliğinden) sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Kherraf, Z. E. Ve ark.'larının (206) yaptığı çalışmada Ayhan, Ö. ve ark'larının (205) yaptığı çalışma sonucu saptadıkları homozigot, *ZMYND15*:c.1520_1523delAACA(p.K507Sfs*3) varyantı kendi çalışmalarında makrozoospermik ve şiddetli oligozospermik Türk hastada gözlemlemişlerdir. Bu varyantın nadir ve Türk kökenli olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu varyantın şiddetli oligozospermik 3 Çinli hastada saptandığını da belirtilmiştir. Kherraf, Z. E. ve ark.'larının (207) yaptığı çalışmada gözlemler sonucunda aynı genetik olayın (*ZMYND15* geninde oluşan varyantların), farkı fenotipler ile karşımıza çıkabileceğinin altını çizmişlerdir.

INF3 numaralı hastamızda *ZMYND15* geninde saptadığımız heterozigot, *ZMYND15*:c.1898G>A p.(Arg633His) varyantın global alel frekansı 0.0025 (615/246070 GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli bildirilmemiştir. 209 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın *ZMYND15* geninin bir allelini (heterozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi görülmesi beklenmese de veri tabanlarında kalıtım şeklinin belirtilmemesinden dolayı varyantın göz ardı edilmemesi gerektiğini düşünmekteyiz.

DNAH1 geni, sperm aksoneminin organizasyonu ve biyogenezi için önemlidir (117, 118). OMIM'de Spermatojenik Hata 18 (SPGF18) (OMIM*617576) ile gen-fenotip ilişkisi göstermiştir. AR kalıtım göstermektedir. SPGF18, internal genitalyada fenotipik etkileri görülebilir. Bu etkilerden bazıları primer infertilite, sperm hareketliliğinin azalması veya yokluğu, sperm kamçısında morfolojik kusurlarıdır (115). Yang, X. ve ark.'larının (124) yaptığı çalışmada (87 hasta idiyopatik astenozoospermik ve 200 hasta NOA) 3 NOA tanılı hastada heterozigot, *DNAH1:*c.6446T>G (p.L2149R), heterozigot, *DNAH1*:c.11412del (p.F3804fs), heterozigot, *DNAH1*:c.7201del (P.G2401fs) ve heterozigot: *DNAH1*:c.7205C>A (p.A2402D) olmak üzere 4 farklı varyant saptanmıştır. *DNAH1*:c.11412del (p.F3804fs) 71. ekzonda, *DNAH1*:c.7201del (P.G2401fs) ise 47. ekzonda çerçeve kaymasına neden olduğu ve diğer iki

varyantın protein fonksiyonu üzerinde zararlı etkileri olabilen yanlış anlamlı (missense) mutasyonlar olduğu bildirilmiştir. Sonuçlara bağlı olarak *DNAH1* geninin azospermik hastalarda değerlendirilmesi gerektiğini eklemişlerdir.

INF4 numaralı hastamızda *DNAH1* geninde saptadığımız heterozigot, *DNAH1*:c.10216G>A (p.Val3406Ile) varyantın global alel frekansı 0.002657 (656/246858 GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli bildirilmemiştir. 487 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın literatür taraması doğrultusunda fenotipe etkisi beklenmektedir.

INF11 numaralı hastamızda *DNAH1* geninde saptadığımız heterozigot, *DNAH1*:c.9495G>A (p.Thr3165) varyantın global alel frekansı 0.000004 (1/235768 GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli bildirilmemiştir. 238 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın literatür taraması doğrultusunda fenotipe etkisi beklenmektedir.

INF16 numaralı hastamızda *DNAH1* geninde saptadığımız heterozigot, *DNAH1*:c.4642C>G (p.L1548V) varyantın global alel frekansı bildirilmemiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli bildirilmemiştir. 353 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın literatür taraması doğrultusunda fenotipe etkisi beklenmektedir.

DPY19L2 geni, akrozomun spermatozoa çekirdeğine sabitlenmesinde rol oynayan bir proteini kodlar. İnsan globozospermisinin etiyolojisinde rol oynayan ana gen olarak kabul edilir (134). OMIM'de Spermatojenik Hata 9 (SPGF9) (OMIM*613958) ile gen-fenotip ilişkisi göstermiştir. AR kalıtım göstermektedir. SPGF9, internal genitalyada fenotipik etkileri görülebilir. Bu etkiler globozoospermia ve normal veya normale yakın sperm miktarıdır (126). López-Rodrigo, O. ve ark.'larının (129) yaptığı 2 akraba İspanyol globozoospermik hastalar üzerinde yapılan çalışmada her iki hastada da *DPY19L2*:c.431T>A (3. ekzon) ve *DPY19L2*: c.869G>A (8.ekzon) birleşik heterozigot varyant saptanmıştır.

INF10 numaralı hastamızda *DPY19L2* geninde saptadığımız heterozigot, *DPY19L2*:c.2221C>A (p.P741T) varyantın global alel frekansı 0.000014 (2/140192 GnomAD) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli resesif olarak bildirilmiştir. 853 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın *DPY19L2* geninin

bir allelini (heterozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi beklenmemektedir. Panel içeriğindeki genlerin dışında, infertilite ve/veya azospermi ile ilişkili genlerde başka bir varyantın bulunma olasılığını düşünmekteyiz.

INF37 numaralı hastamızda *DPY19L2* geninde saptadığımız heterozigot, *DPY19L2*:c.247C>T (p.Q83*) varyantın global alel frekansı bildirilmemiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli resesif olarak bildirilmiştir. 776 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "Olası Patojenik" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyant yeni varyanttır. Hasta için varyantın değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

SEPTIN12 geni, SEPTIN gen ailesinin bir üyesidir. Memelilerde yüksek oranda korunmuştur. Spermatogenez için önemli önemli bir gendir. Sperm hücrelerinin yapısal bütünlüğünü korumak için gerekli olan testise özgü bir GTP bağlayıcı proteini kodlar (149). OMIM'de Spermatojenik Hata 10 (SPGF10) (OMIM*614822) ile gen-fenotip ilişkisi göstermiştir. Otozomal dominant (AD) kalıtım göstermektedir. SPGF10, internal genitalyada fenotipik etkileri görülebilir. Bu etkiler infertilite, spermatojenik hata ve bazı hastalarda teratozoospermi, asthenoteratozoospermi ve oligoasthenozoospermidir (135). Miyamoto, t. Ve ark.'larının (144) yaptığı çalışmada mayotik arrest nedeniyle azospermisi olan 30 erkek ve 140 fertil erkek kontrolünde *SEPTIN12* mutasyon analizi yapmıştır. 30 hastada ekson 2'de *SEPTIN12*:c.204G>C (p.Gln38His), ekson 4'te *SEPTIN12*:c.422C>A (p.Thr111Lys) ve ekson 5'te *SEPTIN12*:c.564G>A varyantları saptanmıştır. Varyantların mayotik arrestin neden olduğu azospermiye karşı artan duyarlılık ile bir ilişkisi olduğu bildirilmiştir. Miyamoto, t. Ve ark.'larının (208) yaptığı çalışmada *SEPTIN12* geninin kodlama bölgelerinin doğrudan dizilenmesiyle sertoli hücreli sendorumuna (SCOS) neden olduğu azospermisi olan 100 Japon hastayı araştırmışlardır. Çalışma sonucunda 8 nükleotid değişikliği saptamışlardır: ekson 2'de *SEPTIN12*:c.192T>C, *SEPTIN12*:c.204G>C (Gln38His), *SEPTIN12*:c.210G>A ve *SEPTIN12*:c.225G>A; ekson 4'te *SEPTIN12*:c.422C>A (Thr111Lys), *SEPTIN12*:c.423G>C ve *SEPTIN12*:c.426C>T; ve ekson 5'te *SEPTIN12*:c.564G>A. *SEPTIN12* geninde yer alan tek nükleotid polimorfizmlerin (SNP), erkeklerde spermatogenezde bir kusura yatkın hale getirebileceğini ve NOA'nın bir nedeni olarak SCOS olabildiğini göstermişlerdir. Deng, D. Ve ark.'ları (138) NOA tanısı alan 200 infertil erkekte spermatogenez ile ilişkili 25 gende hedeflenen ekzom dizilimi çalışması sonucunda, 29 yaşındaki Çinli NOA tanılı bir erkek hastada (kromozom analizi normal 46, XY karyotipi ve Y kromozom mikrodelesyonu göstermeyen ve SCOS tanılı) *SEPT12*:c.673C>A (p.Gln225Lys) varyantı saptanmıştır. Varyant heterozigot, 7.

ekson içinde yer alan tek bir nükleotid değişikliği içeren ve protein yapısını değiştirme potansiyeline sahip bir yanlış anlamlı mutasyondur. Varyantının hastada spermatogenez yetmezliği ile ilişkili olabileceğini bildirmektedirler.

INF11 numaralı hastamızda *SEPTIN12* geninde saptadığımız heterozigot, *SEPTIN12*:c.611G>T (p.Arg204Leu) varyantın global alel frekansı 0.00000796 (GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli dominant olarak bildirilmiştir. 270 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın *SEPTIN12* geninin bir allelini (heterozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi beklenmektedir.

INF29 numaralı hastamızda *SEPTIN12* geninde saptadığımız heterozigot, *SEPTIN12*:c.208T>C (p.Phe70Leu) varyantın global alel frekansı bildirilmemiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli dominant ve fonksiyon kaybı gösterdiği bildirilmiştir. 161 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın *SEPTIN12* geninin bir allelini (heterozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi beklenmektedir.

KLHL10 geni, memelilerde evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş testise özgü bir proteindir. Spermatidlerin sitoplazmasında eksprese edilir. Spermatogenez sürecinde spermatid gelişiminde önemlidir (151). OMIM'de Spermatojenik Hata 11 (SPGF11) (OMIM*615081) ile gen-fenotip ilişkisi göstermiştir. AD kalıtım göstermektedir. SPGF11, internal genitalyada fenotipik etkileri görülebilir. Bu etkiler infertilite, spermatojenik hata, oligozoospermi, bazı hastalarda teratozoospermi ve asthenozoospermi görülmesidir (145). Cannarella, R. ve ark.'larının (148) birbirinden bağımsız 25 infertil erkek hasta (7 hasta NOA tanılı) üzerinden yaptığı çalışmada NOA tanısı alan bir hastada 3'UTR bölgesinde bulunan NM_152467(*KLHL10*):C.5 >G varyantı saptanmıştır. Araujo, T. F. Ve ark.'larının (150) 16 infertil hasta üzerinde yaptıkları çalışmada NOA tanılı 1 hastada NM_001329595.1(*KLHL10*):c.242A>T (p.Asn81Ile) varyantı saptanmıştır. Varyantı olası patojenik yanlış anlamlı varyant olarak raporlamışlardır. Çalışma sonucunda, *KLHL10* geninin erkek infertilitesi ile ilişkili olduğunu ve NOA için sorumlu genler arasında yer alabileceğini bildirmişlerdir.

INF11 numaralı hastamızda *KLHL10* geninde saptadığımız heterozigot, *KLHL10*:c.1226A>G (p.E409G) varyantın global alel frekansı bilinmemektedir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli dominant olarak bildirilmiştir. 468 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Literatürde *KLHL10*:c.1226A>G (p.E409G) varyantı ile ilişkili yapılmış fonksiyonel bir çalışma

bulunmamaktadır. Hastamızda saptamış olduğumuz varyant yeni varyanttır ve varyantın *KLHL10* geninin bir allelini (heterozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi beklenmektedir.

DDX25 geni, dead-box helikaz protein ailesinin bir üyesidir. Diğer adı ile *GRTH* olarak bilinmektedir. Leydig hücreleri ve mayotik spermatosit ve spermatidler olmak üzere germ hücrelerinde bulunur. Germ hücrelerin gelişimi sırasında ilgili genlerin post-transkripsiyonel düzenleyicisi olarak spermatogenezin tamamlanmasında kritik bir rol oynamaktadır (154-160). Zhang, S. ve ark'larının (154) idiyopatik azoospermili 228 infertil erkek, şiddetli oligozoospermili 119 infertil erkek ve 201 fertil erkek üzerinden yaptığı *GRTH* geninin ekzon ve intron/ekson sınırlarının mutasyon taraması sonucunda 4 tane SNP (IVS6+55G→T, IVS8+10A→C, c.852C→T ve c.927G→A) tanımlanmıştır. IVS6+55G→T ve c.852C→T SNP'leri, azospermi veya şiddetli oligozoospermi ile erkek infertilitesi arasında önemli bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Jaiswal, D. ve ark.'ları (209) *DDX25:*IVS6+55G>T ve *DDX25*:c.852C>T polimorfizmlerinin erkek infertilitesi üzerindeki etkisini 338 bireyde (174 idiyopatik azospermik infertil erkek, 164 fertil kontrol) araştırmışlardır. *DDX25*:c.852C>T ile erkek infertilitesi arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptamışlar. *DDX25:*IVS6+55G>T ve *DDX25*:c.852C>T polimorfizmlerinin haplotip GC'sinde NOA ile ilişkisi olduğu ortaya koyulmuştur.

INF15 numaralı hastamızda *DDX25* geninde saptadığımız heterozigot, *DDX25*:c.110C>T (p.Ala37Val) varyantın global alel frekansı 0.00000401 (GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şeklinin belirtilmemiştir. 306 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın kalıtım şeklinin bilinmemesi ve literatür çalışmaları doğrultusunda fenotipe etkisi açısından varyantın göz ardı edilmemesini düşünmekteyiz.

LHB geni, LHβ olarak da bilinmektedir. Lüteinize edici hormunun beta alt birimini kodlar. Gonad olgunlaşmasında, erkeklerin postnatal gelişiminde ve fertilizasyonda önemli bir rol oynar (163). OMIM'de Hipogonadotropik Hipogonadizm 23 anosmi ile veya olmadan (HH23) (OMIM*228300) ile gen-fenotip ilişkisi göstermiştir. AR kalıtım göstermektedir. HH23, erkek eksternal ve internal genitalyada fenotipik etkileri görülebilir. Eksternal genitalyaya etkisi küçük penis olarak bildirilmiştir. İnternal genitalyaya etkisi ise küçük veya normal testisler, düşük semen hacmi, azalmış veya yok olan spermatogenez, azalmış veya yok olan leydig hücreleri ve testiküler mikrolitiazisdır (161). Basciani, S. ve ark.'ları (210) gecikmiş puberte ve azospermi ile başvuran ve dolaşımdaki LH yokluğu ile ilişkili hipogonadizmi bulunan 31 yaşındaki erkek hasta üzerinde yaptıkları araştırmada, *LHB* geninde 2.ekzonda 12 bp delesyon (28_39del) ve birleşik heterozigot durumda olan 5'splice bölgesinde IVS2 + 1G →T saptanmıştır. 28_39del,

sinyal peptidinin hidrofobik çekirdeğindeki dört lösinin delesyonu, IVS2 + 1G →T ise haberci RNA'nın (mRNA) eklenmesini (splicing) bozarak LHB mRNA'sının işlenmesinde büyük bir anormallik oluşturarak, lüteinize edici hormonun salgılanmasını engeller. Homozigot, IVS2 + 1G →T varyantı, Lofrano-Porto, A. Ve ark.'larının (165) yaptığı çalışmada 38 yaşında azospermik bir kişide daha tespit edilmiştir.

INF22 ve INF23 numaralı hastalarımızda *LHB* geninde saptadığımız homozigot, *LHB*:c.169T>C (p.Tyr57His) varyantın global alel frekansı 0.000076 (19/248614 GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şeklinin resesif ve fonksiyon kaybına neden olduğu belirtilmiştir. INF22 numaralı hastadan 95, INF23 numaralı hastadan 114 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "Olası Patojenik" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın literatür taramaları doğrultusunda *LHB* geninin iki allelini (homozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi beklenmektedir.

CATSPER1 geni, insanlarda ve farelerde yüksek oranda korunmuş, sperme özgü alkalileştirmeyle aktive olan dört katyon kanalından (CATSPER-1, -2, -3, -4) oluşan bir ailenin üyesidir. Kalsiyum (Ca^{2+}) taşınmasında rol oynayan ve sperm motilitesinde önemli bir rol oynayan bir iyon kanalını kodlar (169). OMIM'de Spermatojenik Hata 7 (SPGF7) (OMIM*612997) ile gen-fenotip ilişkisi göstermiştir. AR kalıtım göstermektedir. SPGF7, internal genitalyada fenotipik etkileri görülebilir. Bu etkiler infertilite, nonmotile sperm, sperm hareketliliğinin azalması, sperm sayısının azlığı, semen hacminin azalması ve anormal yapıda spermatozoa görülmektedir (167). Behvarz, M. ve ark.'larının (169) 100 infertil (idiyopatik azospermik ve oligospermik hastalar) ve 100 sağlıklı kontrolleri içeren çalışmasında *CATSPER1* (rs2845570) gen polimorfizmlerinin idiyopatik azospermik hastalarda anlamlı bir ilişki gösterdiği bildirilmiştir.

INF16 numaralı hastamızda *CATSPER1* geninde saptadığımız heterozigot, *CATSPER1*:c.2064+6G>A varyantın global alel frekansı bildirilmemiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli bildirilmemiştir. 454 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz *CATSPER1* geninin bir allelini (heterozigot) kapsayan varyantın yapılan literatür araştırmaları sonucunda fenotipe etkisi beklenmektedir.

NPHP4 geni, primer siliyerin düzgün oluşumu için gerekli olan ancak aynı zamanda hücre-hücre yapışması ve proliferasyonu ile bağlantılı olan yüksek oranda korunmuş bir protein olan nefrosistin-4'ü kodlar (176). OMIM'de Nefronofitiz 4 (OMIM*606966) ve Senior-Loken sendromu 4 (OMIM*606996) ile gen-fenotip ilişkisi göstermiştir. AR kalıtım göstermektedirler (174). Won, J. Ve ark.'larının (176) *NPHP4* mutant fare çalışmasında, yetersiz sperm miktarı

ve sperm hareketliliği kaynaklı infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir. *NPHP4*'ün erkek üreme organlarında nasıl çalıştığını daha fazla açıklamak için değerli bir araç olduğunu not düşmüşlerdir. Alazami, A. Ve ark.'larının yaptığı çalışmada (177), ilk kez 17 yaşındaki erkek bir hastada *NPHP4* (c.2044C>T, p.R682*; NM_015102.3) homozigot kırpma varyantının neden olduğu insan erkek infertilitesi ve Serebello-okülo-renal sendromu gözlenmiştir.

INF4 numaralı hastamızda *NPHP4* geninde saptadığımız heterozigot, *NPHP4*:c.3574C>T (p.Arg1192Trp) varyantın global alel frekansı 0.001814 (412/217148 GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli resesif olarak bildirilmiştir. 221 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın fenotipe etkisini öngörebilmek için detaylı fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır.

FKBPL geni diğer adlarıyla DIR1 veya WISp39, FK506 bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir. Testis dokusunda güçlü bir şekilde eksprese edilir ve testiste androjen reseptörü aracılı sinyalleşmeye katılır. İnsan ve farelerde spermatogenez ve fertilizasyon ile ilişkili bir gendir. Ni, B. Ve ark'larının (190) 3 aşamalı ekzom çapında NOA tanılı hastalarda yaptığı çalışmada, *FKBPL*:c.410C>T (p.Pro137Leu) (rs200847762) varyantı saptanmıştır. Yanlış anlamlı varyantın seks hormonu metabolik yolunun dengesizlikleri yoluyla NOA'ya sebep olduğu bildirilmiştir. Akyuz Sengun, D ve ark.'nın (191) yaptığı normal karyotipe sahip (46, XY) 30 azospermik erkek hasta ve 10 sağlıklı kontrol grubunu içeren çalışmada 2 azospermik hastada *FKBPL*:c.229_240dup p.(Ser77_Ser80dup) yeni (novel) varyant tespit edilmiş olup, azospermi fenotipi ile ilşkilendirilmiştir. Bu varyant *FKBPL* geninin 2. ekzonunda 4 bazlık değişim ile FKBPL proteinin 3 boyutlu (3D) yapısını bozan varyant olarak bildirilmiştir.

INF22 numaralı hastamızda *FKBPL* geninde saptadığımız heterozigot, *FKBPL*:c.229_240dup p.(Ser77_Ser80dup) varyantın global alel frekansı 0.0070 (1770/251452 GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli bildirilmemiştir. 157 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın *FKBPL* geninin bir allelini (heterozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi beklenmektedir.

CFTR geni, bir klorür kanalı olarak işlev görmenin yanı sıra diğer birçok taşıma yollarının düzenlenmesini kontrol eder. Erkek genital sisteminde bulunan vas deferansı düzenleyen bir membran iyon kanalı proteini kodlar (180-182). OMIM'de CBAVD (OMIM*277180) ve KF (OMIM*219700) ile gen-fenotip ilişkisi göstermiştir. Her ikisi de AR kalıtım göstermektedir. CBAVD, klinik bulguları arasında azospermi ile ilişkilendirilmiştir. KF ise klinik bulguları arasında CBAVD'ye bağlı erkek infertilisi (%98) gözlenebileceği bildirilmiştir (178). Field,

P.D. ve Martin, N.J. ‘nin (211) 5600 infertil hastada (%84 kadın ve %14 erkek) 30 CFTR mutasyonu taranmıştır. Tarama sonucunda *CFTR*:c.1521_1523del (p.Phe508del) varyantının çalışmada en yaygın görülen varyant (%70,9) olarak bildirilmiştir. Özellikle homozigot, *CFTR*:c.1521_1523del (p.Phe508del) varyantının erkek hastaların %95’inden fazlasında infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir. *CFTR*: c.350G>A (p.R117H) varyantının önemli ölçüde artış gösterdiği ve tanımlanan varyantların %13,8’ini (kadınlarda %12,2 ve erkeklerde %18,5) oluşturduğu bildirilmiştir. *CFTR*: c.350G>A (p.R117H) varyantına sahip erkek infertil hastaların CBAVD ile artan bir ilişkiye sahip olduğu ve varyantın erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Yang, L. ve ark.’ları (180) *CFTR* genindeki ΔF508 ve IVS8-5T genetik mutasyonun NOA ve oligozoospermiye katkısını belirleyen ilk meta-analizi yapılmıştır. Pubmed, Web of Science, Embase ve Çin ulusal bilgi altyapısı (CNKI) veri tabanları referans alınmıştır. IVS8-5T varyantının obstrüktif olmayan erkek infertilitesi özellikle NOA riski ile pozitif olarak ilişkili olabileceğini, ancak ΔF508 varyantının bu riske daha küçük katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Batiha, O. ve ark.’ları (187) 69 azospermik Ürdünlü hastada 100’den fazla erkek infertilitesi ile ilgili geni kapsayan NGS tabanlı bir panel kullanarak gerçekleştirmişlerdir. 2 farklı hastada varyant (Homozigot, *CFTR*:c.3909C>G p.(Asn1303Lys) ve homozigot, *CFTR*:c.3454G>C p.(Asp1152His)) tespit edilmiştir ve 2 hastada KF ya da CBAVD endikasyonu bulunmamaktadır. Chen, H. ve ark.’ları (212) *CFTR*, erkek fertilitesi ve infertilitesi ile ilgili konularda ilgili anahtar kelimelerle makaleler için literatür veri tabanı taraması yapmıştır. *CFTR* varyantları ile erkek infertilitesi arasındaki kurulmuş en iyi ilişkinin CBAVD olduğu ve CBAVD’nin anatomik özellikleri arasında obstrüktif azospermiye yol açabileceği belirtilmiştir. *CFTR* genindeki F508del, R117H, W1282X, G542X ve 5T/7T/9T varyantlarının literatür taraması sonunda NOA ile fenotipe yansıdığı bildirilmiştir. Aynı zamanda *CFTR* heterozigot varyantlarının CBAVD dışındaki erkek infertilitesi riskini de artırabileceğini vurgulamışlardır.

INF4, INF21 ve INF37 numaralı hastalarımızda *CFTR* geninde saptadığımız heterozigot, *CFTR*:c.1521_1523delCTT (p.Phe508del) varyantın global alel frekansı 0.00707 (1776/251256 GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli resesif ve fonksiyon kazanımı gösterdiği bildirilmiştir. INF4 hastasında 598, INF21 hastasında 541 ve INF37 hastasında 462 okuma alınmıştır. Varyantın yapılan in-siliko analiz sonunda “Patojenik” olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın literatür çalışmaları doğrultusunda fenotipe etkisi beklenmektedir.

INF8 numaralı hastamızda *CFTR* geninde saptadığımız heterozigot, *CFTR*:c.3154T>G (p.Phe1052Val) varyantın global alel frekansı 0.000392 (55/140184 GnomAD) olarak bildiril-

miştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli resesif ve fonksiyon kaybı gösterdiği bildirilmiştir. 406 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "Patojenik" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın *CFTR* geninin bir allelini (heterozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi beklenmemektedir. Ancak varyantın yapılan in-sliko analizler sonucunda patojenik olarak bildirilmesi ve *CFTR* genindeki varyantların erkek infertilite riskini arttırmasından dolayı hasta için bu varyantın göz ardı edilmemesi gerektiğini düşünmekteyiz.

INF10 numaralı hastamızda *CFTR* geninde saptadığımız heterozigot, *CFTR*: c.890G>A (p.Arg297Gln) varyantın global alel frekansı 0.000567 (142/250572 GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli bildirilmemiş ama fonkiyon kaybı gösterdiği bildirilmiştir. 267 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın yapılan literatür taraması sonunda *CFTR* geninin bir allelini (heterozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi beklenmektedir.

INF13 numaralı hastamızda *CFTR* geninde saptadığımız heterozigot, *CFTR*:c.3256A>G (p.Thr1086Ala) varyantın global alel frekansı 0.00000398 (GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli bildirilmemiş ama fonkiyon kaybı gösterdiği bildirilmiştir. 235 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "VUS" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın yapılan literatür taraması sonunda *CFTR* geninin bir allelini (heterozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi beklenmektedir.

INF28 numaralı hastamızda *CFTR* geninde saptadığımız heterozigot, *CFTR*: c.350G>A (p.R117H) varyantın global alel frekansı 0.00149 (GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli resesif ve fonksiyon kaybı gösterdiği bildirilmiştir. 214 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "Patojenik" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın *CFTR* geninin bir allelini (heterozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi beklenmemektedir. Ancak varyantın yapılan in-sliko analizler sonucunda patojenik olarak bildirilmesi ve *CFTR* genindeki varyantların erkek infertilite riskini arttırmasından dolayı hasta için bu varyantın göz ardı edilmemesi gerektiğini düşünmekteyiz.

INF29 numaralı hastamızda *CFTR* geninde saptadığımız homozigot, *CFTR*:c.1397C>T (p.S466L) varyantın global alel frekansı 0.0000285 (4/140154 GnomAD) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli resesif ve fonksiyon kaybı gösterdiği bildirilmiştir. 288 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda

"Patojenik" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın *CFTR* geninin iki allelini (homozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi beklenmektedir.

INF33 numaralı hastamızda *CFTR* geninde saptadığımız heterozigot, *CFTR*:c.3872A>G (p.Q1291R) varyantın global alel frekansı 0.00000399 (1/250580 GnomAD) olarak bildirilmiştir. Qiagen Clinical Insight çevrimiçi veri tabanında varyantın kalıtım şekli resesif ve fonksiyon kazanımı gösterdiği bildirilmiştir. 331 okuma alınmıştır. Varyant yapılan in-siliko analiz sonunda "Olası Patojenik" olarak değerlendirildi. Hastamızda saptamış olduğumuz varyantın *CFTR* geninin bir allelini (heterozigot) kapsaması nedeniyle fenotipe etkisi beklenmemektedir. Ancak hasta için bu varyantın göz ardı edilmemesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda NOA tanısı alan hastalarda saptamış olduğumuz 24 varyantı, hastaların klinik bulguları ile birlikte değerlendirdiğimizde, %54,16 oranında anlamlı bir fenotip-genotip ilişkisi kuruldu. Varyantların de novo veya ailesel aktarım paternlerini belirlemek amacıyla her bir varyasyon için Sanger dizileme aşaması devam etmektedir. Hastalarımıza ileriye yönelik tedavi açısından ise preimpilantasyon genetik tanı (PGT) önerilmiştir.

NOA veya azosperminin kalıtım şekilleri genellikle heterojen ve komplekstir. Bu kalıtım şekillerinde ilgili ve aday genler ile çevresel faktörlerin hastalık üzerine etkisi görülmektedir. Ayrıca NOA tanılı hastaların genelinde genetik heterojenitesi dikkati çekmektedir. En önemlisi de birden fazla genin NOA ilişkili olması veya tek bir genin birden çok sendromla bağlantılı olması da hastalığın altında yatan genetik etiyolojinin heterojenliğini ve genetik etiyolojinin belirlenmesinde karşımıza zorluklar çıkarmaktadır. Bundan dolayı hedefli NGS paneli çalışılması NOA'nın klinik olarak ilgili nedenlerinin belirlenmesi, genetik danışmanlık da dahil olmak üzere hastalara uygun danışmanlık ve tedavinin sağlanması açısından klinik tanıya katkısı olabileceğini düşünmekteyiz. Aynı zamanda literatür çalışmaları doğrultusunda hastalarda tam ekzom dizileme (WES) tekniği de tercih edilebilir.

SONUÇLAR

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. NOA ve genetik etiyolojisi hakkında bilgi verebilecek ilişkili olduğu ve olabileceği düşünülen 21 genin (*TERB1, MAJIN, MTRR, PIWIL1, SOX10, SIRPG, SIRPA, DNAH6, MEI1, DNAH17, ZMYND15, DNAH1, DPY19L2, SEPTIN12, KLHL10, DDX25, LHB, CATSPER1, NPHP4, CFTR* ve *FKBPL*) NOA tanısı alan, karyotipi normal ve Y mikrodelesyonu saptanmayan toplamda 40 hasta dahil olduğu bu çalışma sonucunda;

1. Çalışmamızda NOA tanısı alan hastalarda saptamış olduğumuz 24 varyantı, hastaların klinik bulguları ile birlikte değerlendirdiğimizde, %54,16 oranında anlamlı bir fenotip-genotip ilişkisi kuruldu.
2. 2 adet yeni varyant (NM_173812.5(DPY19L2):c.247C>T (p.Q83*) ve NM_152467.5(KLHL10):c.1226A>G (p.E409G)) saptanmıştır.
3. Çalışmamızda özgün primerlerle tasarımını gerçekleştirdiğimiz 21 gen içeren hedefli NGS panelimizin etkinliğinin yeni aday genlerle arttırılabilir.

ÖZET

Dünya çapındaki çiftlerin yaklaşık %10-15'inde görülmekte olan infertilite, klinikte 12 ay veya daha uzun süreli düzenli korunmasız cinsel ilişki durumundan sonra gebelik elde edilememesi olarak tanımlanan hem kadınlarda hem de erkeklerde görülen bir üreme sistemi hastalığıdır. Azospermi, semende spermin yokluğu durumudur. Non-obstrüktif azospermi (NOA) ise erkek infertilitesinin en şiddetli formudur. Spermatogenezde oluşabilecek hatalardan (pretestiküler ve testiküler) kaynaklanmaktadır.

Çalışmamıza Trakya Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezine non-obstrüktif azospermi öyküsü ile yönlendirilen, sayısal ve yapısal kromozom anomalisi ve Y kromozomunda mikrodelesyon saptanmayan 40 erkek hasta dahil edilmiştir. 21 geni (*TERB1, MAJIN, MTRR, PIWIL1, SOX10, SIRPG, SIRPA, DNAH6, MEI1, DNAH17, ZMYND15, DNAH1, DPY19L2, SEPTIN12, KLHL10, DDX25, LHB, CATSPER1, NPHP4, CFTR* ve *FKBPL*) içinde barındıran özgün tasarlanmış çoklu gen paneli kullanılarak yeni nesil dizi analizi (NGS) teknolojisiyle non-obstrüktif azosperminin genetik etiyolojinin araştırılmıştır.

Çalışmamızda 40 hastanın 17'sinde (%42,5) 13 farklı gende 24 varyant saptandı. ACMG-2015 kriterlerine göre 6'sı patojenik, 5'i olası patojenik ve 18'i klinik önemi belirsiz (VUS) varyant saptandı. 2 gende (*DPY19L2* ve *KLHL10*) yeni varyant saptandı.

Dünya çapında üreme sistemi hastalıklarında önemli bir artış gözlenmektedir. İnfertilite bu hastalıklardan bir tanesidir. Non-obstrüktif azospermi ise erkek infertilitesinin en şiddetli formudur. Genetik ve klinik olarak heterojen bir endikasyondur. Bundan dolayı non-obstrüktif azospermi tanısı almış infertil hastalarda özgün tasarlanmış çoklu gen panellerinin yeni nesil

dizilenmesi tanı süreçlerine yardımcı olabileceği ve genetik danışmanlık da dahil olmak üzere hastalara uygun danışmanlık ve tedavinin sağlanması açısından kritik öneme sahip olabileceği öngörüsündeyiz.

Anahtar Kelimeler: İnfertilite, Azospermi, Non-obstrüktif azospermi (NOA), Yeni nesil dizi analizi (NGS)

INVESTIGATION OF GENETIC ETIOLOGY IN NON-OBSTRUCTIVE AZOSPERMIC (NOA) INFERTILITY PATIENTS WITH NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

SUMMARY

Infertility, which is seen in approximately 10-15% of couples worldwide, is a reproductive system disease seen in both women and men, which is clinically defined as the inability to achieve pregnancy after 12 months or more of regular unprotected sexual intercourse. Azoospermia is the absence of sperm in the semen. Non-obstructive azoospermia (NOA) is the most severe form of male infertility. It is caused by errors that may occur in spermatogenesis (pretesticular and testicular).

Forty male patients who were referred to Trakya University, Department of Medical Genetics, Genetic Diseases Evaluation Center with a history of non-obstructive azoospermia, who had no numerical and structural chromosomal anomaly and no microdeletion in the Y chromosome were included in our study. The genetic etiology of non-obstructive azoospermia was investigated with next-generation sequencing (NGS) technology, using a custom designed multi-gene panel containing 21 genes (*TERB1, MAJIN, MTRR, PIWIL1, SOX10, SIRPG, SIRPA, DNAH6, MEI1, DNAH17, ZMYND15, DNAH1, DPY19L2, SEPTIN12, KLHL10, DDX25, LHB, CATSPER1, NPHP4, CFTR* and *FKBPL*).

In our study, 24 variants in 13 different genes were detected in 17 (42.5%) of 40 patients. According to the ACMG-2015 criteria, 6 pathogenic variants, 5 probable pathogenic variants

and 18 variant of uncertain significance (VUS) variants were detected. A novel variant was detected in 2 genes (DPY19L2 and KLHL10).

There is a significant increase in reproductive system diseases worldwide. Infertility is one of these diseases. Non-obstructive azoospermia is the most severe form of male infertility. It is a genetically and clinically heterogeneous indication. Therefore, we predict that next-generation sequencing of custom designed multi-gene panels in infertile patients diagnosed with non-obstructive azoospermia may help the diagnostic processes and be of critical importance in terms of providing appropriate counseling and treatment, including genetic counseling.

Keywords: Infertility, Azoospermia, Non-obstructive azoospermia (NOA), Next generation sequencing (NGS)

KAYNAKLAR

1. Salas-Huetos A, Tüttelmann F, Wyrwoll MJ, Kliesch S, Lopes AM, Goncalves J, et al. Disruption of human meiotic telomere complex genes TERB1, TERB2 and MAJIN in men with non-obstructive azoospermia. Hum Genet. 2021;140(1):217-27.

2. Hu TY, Zhang H, Meng LL, Yuan SM, Tu CF, Du J, et al. Novel homozygous truncating variants in ZMYND15 causing severe oligozoospermia and their implications for male infertility. Hum Mutat. 2021;42(1):31-6.

3. An M, Liu Y, Zhang M, Hu K, Jin Y, Xu S, et al. Targeted next-generation sequencing panel screening of 668 Chinese patients with non-obstructive azoospermia. J Assist Reprod Genet. 2021;38(8):1997-2005.

4. Kadıoğlu A, Çayan, S., Semerci, B., Orhan, R., Aşçı, Ö., Yaman ve ark.'ları. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi. İstanbul: Androloji Derneği 2004.

5. Ross MH, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas : with Correlated Cell and Molecular Biology: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2011. p. 784 - 816.

6. Gartner LP. Cell Biology and Histology: Wolters Kluwer; 2018. p. 311 - 322.

7. Dunleavy JE, O'Bryan MK, Stanton PG, O'Donnell L. The cytoskeleton in spermatogenesis. Reproduction. 2019;157(2):R53-R72.

8. de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. Hum Reprod. 1998;13(suppl_1):1-8.

9. Kuchakulla M, Narasimman M, Khodamoradi K, Khosravizadeh Z, Ramasamy R. How defective spermatogenesis affects sperm DNA integrity. Andrologia. 2021;53(1):e13615.

10. Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. Reprod Biomed Online. 2015;31(3):309-19.

11. Kızılay F, Altay B. Spermatogenez, spermiyogenezis ve klinik yansımaları. Androloji Bülteni. 2019;21(4):177-84.

12. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Palme Yayıncılık; 2006. p. 531.

13. Lee JY, Dada R, Sabanegh E, Carpi A, Agarwal A. Role of genetics in azoospermia. Urology. 2011;77(3):598-601.

14. Vander Borght M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clin Biochem. 2018;62:2-10.

15. ORGANİSATİON WH. Infertility 14 eylül 2020. Access date: 19 ekim 2021 [Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility.

16. Poongothai J, Gopenath T, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore Med J. 2009;50(4):336-47.

17. Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R. The epidemiology and etiology of azoospermia. Clinics. 2013;68:15-26.

18. Krausz C, Cioppi F, Riera-Escamilla A. Testing for genetic contributions to infertility: potential clinical impact. Expert Rev Mol Diagn. 2018;18(4):331-46.

19. O'brien KLf, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. Fertil Steril. 2010;93(1):1-12.

20. Akinsal EC, Baydilli N, Bayramov R, Ekmekcioglu O. A rare cause of male infertility: 45, X/46, XY mosaicism. Urol Int. 2018;101(4):481-5.

21. Ketheeswaran S, Alsbjerg B, Christensen P, Gravholt CH, Humaidan P. 45, X/46, XY mosaicism and normozoospermia in a patient with male phenotype. Case Rep Med. 2019;2019.

22. Kuroda S, Usui K, Sanjo H, Takeshima T, Kawahara T, Uemura H, et al. Genetic disorders and male infertility. Reprod Med Biol. 2020;19(4):314-22.

23. Almesned RK, Alsuhaibani SS, Alali HJ, Qubbaj WA, Al Hathal NK. Male Infertility in Robertsonian Translocation: A Case Report. Am J Case Rep. 2020;21:e921616-1.

24. Kumar R, Tanwar M, Ammini AC, Kumar R, Gupta NP, Sharma RK, et al. Robertsonian translocation and their role in pathogenesis of recurrent in vitro fertilization failure. Med Sci Monit. 2008;14(12):CR617-CR20.

25. Mayeur A, Ahdad N, Hesters L, Brisset S, Romana S, Tosca L, et al. Chromosomal translocations and semen quality: a study on 144 male translocation carriers. Reprod Biomed Online. 2019;38(1):46-55.

26. Chantot-Bastaraud S, Ravel C, Siffroi J. Underlying karyotype abnormalities in IVF/ICSI patients. Reprod Biomed Online. 2008;16(4):514-22.

27. Chiang H-S, Wu Y-N, Wu C-C, Hwang J-L. Cytogenic and molecular analyses of 46, XX male syndrome with clinical comparison to other groups with testicular azoospermia of genetic origin. J Formos Med Assoc. 2013;112(2):72-8.

28. Oates RD. The genetic basis of male reproductive failure. Urol Clin North Am. 2008;35(2):257-70.

29. Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. Reproductıon. 2003;126(1):13-25.

30. Chantot-Bastaraud S, Ravel C, Berthaut I, McElreavey K, Bouchard P, Mandelbaum J, et al. Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46, XY, inv (1)(p22q42), associated with infertility. Mol Hum Reprod. 2007;13(1):55-9.

31. Armanet N, Tosca L, Brisset S, Liehr T, Tachdjian G. Small supernumerary marker chromosomes in human infertility. Cytogenet Genome Res. 2015;146(2):100-8.

32. Koç A, Onur SÖ, Ergün MA, Perçin EF. Supernumerary marker chromosome 15 in a male with azoospermia and open bite deformity. Asian J Androl. 2009;11(5):617.

33. Song S-H, Park SH, Shin E, Jung JH, Shim SH, Kim DS. Male infertility associated with a supernumerary marker chromosome. World J Mens Health. 2017;35(3):205-8.

34. Akbarzadeh Khiavi M, Jalili A, Safary A, Gharedaghchi Z, Mirinezhad SK, Mehdizadeh A, et al. Karyotypic abnormalities and molecular analysis of Y chromosome microdeletion in Iranian Azeri Turkish population infertile men. Syst Biol Reprod Med. 2020;66(2):140-6.

35. Sadeghi-Nejad H, Oates RD. The Y chromosome and male infertility. Curr Opin Urol. 2008;18(6):628-32.

36. Zhou-Cun A, Yuan Y, Zhang S-Z, Zhang W, Li L. Chromosomal abnormality and Y chromosome microdeletion in Chinese patients with azoospermia or severe Oligozoo-spermia. Acta Genetica Sinica. 2006;33(2):111-6.

37. Shamsi MB, Kumar R, Bhatt A, Bamezai R, Kumar R, Gupta NP, et al. Mitochondrial DNA mutations in etiopathogenesis of male infertility. Indian J Urology. 2008;24(2):150.

38. Carra E, Sangiorgi D, Gattuccio F, Rinaldi AM. Male infertility and mitochondrial DNA. Biochem Biophys Res Commun. 2004;322(1):333-9.

39. Vertika S, Singh KK, Rajender S. Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility–An update. Mitochondrion. 2020;54:26-40.

40. Hirata S, Hoshi K, Shoda T, Mabuchi T. Spermatozoon and mitochondrial DNA. Reprod Med Biol. 2002;1(2):41-7.

41. Rajender S, Rahul P, Mahdi AA. Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. Mitochondrion. 2010;10(5):419-28.

42. O'Connell M, McClure N, Lewis S. A comparison of mitochondrial and nuclear DNA status in testicular sperm from fertile men and those with obstructive azoospermia. Hum Reprod. 2002;17(6):1571-7.

43. Jungwirth A, Diemer T, Dohle G, Giwercman A, Kopa Z, Tournaye H, et al. EAU guidelines on male infertility. Eur Urol. 2019 (19 Ekim 2021).

44. Esteves SC. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia. Asian J Androl. 2015;17(3):459.

45. Thakker S, Persily J, Najari BB. Kallman syndrome and central non-obstructive azoospermia. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2020;34(6):101475.

46. Peña VN, Kohn TP, Herati AS. Genetic mutations contributing to non-obstructive azoospermia. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2020;34(6):101479.

47. Hamada AJ, Esteves SC, Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. Clinics. 2013;68:39-60.

48. Kang C, Punjani N, Schlegel PN. Reproductive chances of men with azoospermia due to spermatogenic dysfunction. J Clin Med. 2021;10(7):1400.

49. Cioppi F, Rosta V, Krausz C. Genetics of azoospermia. Int J Mol Sci. 2021;22(6):3264.

50. Gudeloglu A, Parekattil SJ. Update in the evaluation of the azoospermic male. Clinics. 2013;68:27-34.

51. Ishikawa T. Surgical recovery of sperm in non-obstructive azoospermia. Asian J Androl. 2012;14(1):109.

52. Elzanaty S. Non-obstructive azoospermia and clinical varicocele: therapeutic options. Int Urol Nephrol. 2013;45(3):669-74.

53. OMIM. TELOMERE REPEAT-BINDING BOUQUET FORMATION PROTEIN 1; TERB1. Access date: 20 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/617332.

54. GeneCards. TERB1 Gene - Telomere Repeat Binding Bouquet Formation Protein 1. Access date: 20 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TERB1.

55. Long J, Huang C, Chen Y, Zhang Y, Shi S, Wu L, et al. Telomeric TERB1–TRF1 interaction is crucial for male meiosis. Nat Struct Mol Biol. 2017;24(12):1073-80.

56. Zhang J, Tu Z, Watanabe Y, Shibuya H. Distinct TERB1 domains regulate different protein interactions in meiotic telomere movement. Cell Rep. 2017;21(7):1715-26.

57. Dunce JM, Milburn AE, Gurusaran M, da Cruz I, Sen LT, Benavente R, et al. Structural basis of meiotic telomere attachment to the nuclear envelope by MAJIN-TERB2-TERB1. Nat Commun. 2018;9(1):1-18.

58. OMIM. MEMBRANE-ANCHORED JUNCTION PROTEIN; MAJIN. Access date: 20 ekim 2021. [Available from: https://www.omim.org/entry/617130.

59. GeneCards. MAJIN Gene - Membrane Anchored Junction Protein. Access date: 20 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAJIN.

60. Shibuya H, Hernández-Hernández A, Morimoto A, Negishi L, Höög C, Watanabe Y. MAJIN links telomeric DNA to the nuclear membrane by exchanging telomere cap. Cell. 2015;163(5):1252-66.

61. OMIM. METHIONINE SYNTHASE REDUCTASE; MTRR. Access date: 20 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/602568.

62. GeneCards. MTRR Gene - 5-Methyltetrahydrofolate-Homocysteine Methyltransferase Reductase. Access date: 20 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MTRR&keywords=MTRR.

63. Kurzawski M, Wajda A, Malinowski D, Kazienko A, Kurzawa R, Drozdzik M. Association study of folate-related enzymes (MTHFR, MTR, MTRR) genetic variants with non-obstructive male infertility in a Polish population. Genet Mol Biol. 2015;38:42-7.

64. Mfady DS, Sadiq MF, Khabour OF, Fararjeh AS, Abu-Awad A, Khader Y. Associations of variants in MTHFR and MTRR genes with male infertility in the Jordanian population. Gene. 2014;536(1):40-4.

65. Lee H-C, Jeong Y-M, Lee SH, Cha KY, Song S-H, Kim NK, et al. Association study of four polymorphisms in three folate-related enzyme genes with non-obstructive male infertility. Hum Reprod. 2006;21(12):3162-70.

66. Raigani M, Lakpour N, Soleimani M, Johari B, Sadeghi MR. A Association of MTHFR C677T and MTRR A66G Gene Polymorphisms with Iranian Male Infertility and Its Effect on Seminal Folate and Vitamin B12. Int J Fertil Steril. 2021;15(1):20.

67. Montjean D, Benkhalifa M, Dessolle L, Cohen-Bacrie P, Belloc S, Siffroi J-P, et al. Polymorphisms in MTHFR and MTRR genes associated with blood plasma homocysteine concentration and sperm counts. Fertil Steril. 2011;95(2):635-40.

68. Liu K, Zhao R, Shen M, Ye J, Li X, Huang Y, et al. Role of genetic mutations in folate-related enzyme genes on Male Infertility. Sci Rep. 2015;5(1):1-13.

69. OMIM. PIWI-LIKE 1; PIWIL1. Access date: 20 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/605571.

70. GeneCards. PIWIL1 Gene - Piwi Like RNA-Mediated Gene Silencing 1. Access date: 20 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PIWIL1&keywords=PIWIL1.

71. Docampo MJ, Hadziselimovic F. Molecular pathology of cryptorchidism-induced infertility. Sex Dev. 2015;9(5):269-78.

72. Liu X, Xi Q, Li L, Wang Q, Jiang Y, Zhang H, et al. Targeted Next-Generation Sequencing Identifies Novel Sequence Variations of Genes Associated with Nonobstructive Azoospermia in the Han Population of Northeast China. Med Sci Monit. 2019;25:5801.

73. Hempfling A, Lim S, Adelson D, Evans J, O'Connor A, Qu Z, et al. Expression patterns of HENMT1 and PIWIL1 in human testis: implications for transposon expression. Reproduction. 2017;154(4):363-74.

74. Zhang G-W, Wang L, Chen H, Guan J, Wu Y, Zhao J, et al. Promoter hypermethylation of PIWI/piRNA pathway genes associated with diminished pachytene piRNA production in bovine hybrid male sterility. Epigenetics. 2020;15(9):914-31.

75. Bak CW, Yoon T-K, Choi Y. Functions of PIWI proteins in spermatogenesis. Clin Exp Reprod Med. 2011;38(2):61.

76. OMIM. SRY-BOX 10; SOX10. Access date: 20 ekim 2021. [Available from: https://www.omim.org/entry/602229.

77. GeneCards. SOX10 Gene - SRY-Box Transcription Factor 10. Access date: 20 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SOX10&keywords=SOX10.

8. Balasubramanian R, Crowley Jr WF. Isolated gonadotropin-releasing hormone (GnRH) deficiency. 2017.

79. Li T-F, Wu Q-Y, Zhang C, Li W-W, Zhou Q, Jiang W-J, et al. 46, XX testicular disorder of sexual development with SRY-negative caused by some unidentified mechanisms: a case report and review of the literature. BMC Urol. 2014;14(1):1-8.

80. OMIM. SIGNAL REGULATORY PROTEIN, GAMMA; SIRPG. Access date: 21 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/605466.

81. GeneCards. SIRPG Gene - Signal Regulatory Protein Gamma. Access date: 21 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SIRPG&keywords=SIRPG.

82. Brooke G, Holbrook JD, Brown MH, Barclay AN. Human lymphocytes interact directly with CD47 through a novel member of the signal regulatory protein (SIRP) family. J Immunol. 2004;173(4):2562-70.

83. Lu C, Xu M, Wang R, Qin Y, Wang Y, Wu W, et al. Pathogenic variants screening in five non-obstructive azoospermia-associated genes. Mol Hum Reprod. 2014;20(2):178-83.

84. Gu X, Li H, Chen X, Zhang X, Mei F, Jia M, et al. PEX10, SIRPA-SIRPG, and SOX5 gene polymorphisms are strongly associated with nonobstructive azoospermia susceptibility. J Assist Reprod Genet. 2019;36(4):759-68.

85. Xu M, Qin Y, Qu J, Lu C, Wang Y, Wu W, et al. Evaluation of five candidate genes from GWAS for association with oligozoospermia in a Han Chinese population. PloS one. 2013;8(11):e80374.

86. OMIM. PROTEIN-TYROSINE PHOSPHATASE, NONRECEPTOR TYPE, SUBSTRATE 1; PTPNS1. Access date: 21 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/602461.

87. OMIM. SIRPA Gene - Signal Regulatory Protein Alpha. Access date: 21 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SIRPA&keywords=SIRPA.

88. OMIM. DYNEIN, AXONEMAL, HEAVY CHAIN 6; DNAH6. Access date: 21 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/603336.

89. GeneCards. DNAH6 Gene - Dynein Axonemal Heavy Chain 6. Access date: 21 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DNAH6&keywords=DNAH6.

90. Li L, Sha YW, Xu X, Mei LB, Qiu PP, Ji ZY, et al. DNAH 6 is a novel candidate gene associated with sperm head anomaly. Andrologia. 2018;50(4):e12953.

91. Oud M, Houston B, Volozonoka L, Mastrorosa F, Holt G, Alobaidi B, et al. Exome sequencing reveals variants in known and novel candidate genes for severe sperm motility disorders. Hum Reprod. 2021;36(9):2597-611.

92. Gershoni M, Hauser R, Yogev L, Lehavi O, Azem F, Yavetz H, et al. A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. Genet Med. 2017;19(9):998-1006.

93. Mazaheri Moghaddam M, Mazaheri Moghaddam M, Hamzeiy H, Baghbanzadeh A, Pashazadeh F, Sakhinia E. Genetic basis of acephalic spermatozoa syndrome, and intracytoplasmic sperm injection outcomes in infertile men: a systematic scoping review. J Assist Reprod Genet. 2021;38(3):573-86.

94. Li Y-z, Wu R-f, Zhu X-s, Liu W-s, Ye Y-y, Lu Z-x, et al. Identification of a novel deletion mutation in DPY19L2 from an infertile patient with globozoospermia: a case report. Mol Cytogenet. 2020;13(1):1-6.

95. Liu H, Wei X, Sha Y, Liu W, Gao H, Lin J, et al. Whole-exome sequencing in patients with premature ovarian insufficiency: early detection and early intervention. J Ovarian Res. 2020;13(1):1-8.

96. OMIM. MEIOTIC DOUBLE-STRANDED BREAK FORMATION PROTEIN 1; MEI1. Access date: 21 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/608797.

97. GeneCards. MEI1 Gene - Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein 1. Access date: 21 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MEI1&keywords=MEI1.

98. Sato H, Miyamoto T, Yogev L, Namiki M, Koh E, Hayashi H, et al. Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. J Hum Genet. 2006;51(6):533-40.

99. Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Sato H, Namiki M, et al. Current concepts of human azoospermia and its causes. Reprod Med Biol. 2010;9(3):121-7.

100. Ben Khelifa M, Ghieh F, Boudjenah R, Hue C, Fauvert D, Dard R, et al. A MEI1 homozygous missense mutation associated with meiotic arrest in a consanguineous family. Hum Reprod. 2018;33(6):1034-7.

101. Krausz C, Riera-Escamilla A, Moreno-Mendoza D, Holleman K, Cioppi F, Algaba F, et al. Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. Genet Med. 2020;22(12):1956-66.

102. OMIM. DYNEIN, AXONEMAL, HEAVY CHAIN 17; DNAH17. Access date: 21 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/610063?search=dnah17&highlight=dnah17.

103. GeneCards. DNAH17 Gene - Dynein Axonemal Heavy Chain 17. Access date: 21 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DNAH17&keywords=DNAH17.

104. Song B, Liu C, Gao Y, Marley JL, Li W, Ni X, et al. Novel compound heterozygous variants in dynein axonemal heavy chain 17 cause asthenoteratospermia with sperm flagellar defects. J Genet Genomics. 2020.

105. Zhang B, Ma H, Khan T, Ma A, Li T, Zhang H, et al. A DNAH17 missense variant causes flagella destabilization and asthenozoospermia. J Exp Med. 2020;217(2).

106. Zhang B, Khan I, Liu C, Ma A, Khan A, Zhang Y, et al. Novel loss- of- function variants in DNAH17 cause multiple morphological abnormalities of the sperm flagella in humans and mice. Clin Genet. 2021;99(1):176-86.

107. Sha Y, Wei X, Ding L, Mei L, Huang X, Lin S, et al. DNAH17 is associated with asthenozoospermia and multiple morphological abnormalities of sperm flagella. Ann Hum Genet. 2020;84(3):271-9.

108. Jia M, Shi R, Xue X. Novel DNAH17 mutations associated with fertilization failures after ICSI. Gynecol Endocrinol. 2021;37(8):769-71.

109. OMIM. ZINC FINGER MYND-CONTAINING PROTEIN 15; ZMYND15. Access date: 23 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/614312?search=ZMYND15&highlight=zmynd15.

110. GeneCards. ZMYND15 Gene - Zinc Finger MYND-Type Containing 15. Access date: 23 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZMYND15&keywords=ZMYND15.

111. Yan W, Si Y, Slaymaker S, Li J, Zheng H, Young DL, et al. Zmynd15 encodes a histone deacetylase-dependent transcriptional repressor essential for spermiogenesis and male fertility. J Biol Chem. 2010;285(41):31418-26.

112. Hashemi MS, Mozdarani H, Ghaedi K, Nasr- Esfahani M. Among seven testis- specific molecular markers, SPEM 1 appears to have a significant clinical value for prediction of sperm retrieval in azoospermic men. Andrology. 2018;6(6):890-5.

113. Hashemi M-S, Mozdarani H, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH. Expression of ZMYND15 in testes of azoospermic men and association with sperm retrieval. Urology. 2018;114:99-104.

114. Kherraf Z-E. From azoospermia to macrozoospermia, a phenotypic continuum due to mutations in the ZMYND15 gene. Asian J Androl. 2022;24(3):243.

115. OMIM. DYNEIN, AXONEMAL, HEAVY CHAIN 1; DNAH1. Access date: 23 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/603332?search=dnah1&highlight=dnah1.

116. GeneCards. DNAH1 Gene - Dynein Axonemal Heavy Chain 1. Access date: 23 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DNAH1&keywords=dnah1.

117. Zhuang B-J, Xu S-Y, Dong L, Zhang P-H, Zhuang B-L, Huang X-P, et al. Novel DNAH1 Mutation Loci Lead to Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella and Literature Review. World J Mens Health. 2021;40.

118. Li K, Wang G, Lv M, Wang J, Gao Y, Tang F, et al. Bi-allelic variants in DNAH10 cause asthenoteratozoospermia and male infertility. J Assist Reprod Genet. 2022;39(1):251-9.

119. Sha Y, Yang X, Mei L, Ji Z, Wang X, Ding L, et al. 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):1312-8. e2.

120. Jiang C, Zhang X, Zhang H, Guo J, Zhang C, Li J, et al. Novel bi-allelic mutations in DNAH1 cause multiple morphological abnormalities of the sperm flagella resulting in male infertility. Transl Androl Urol. 2021;10(4):1656.

121. Chau MHK. Investigation of the genetic etiology in male infertility with apparently balanced chromosomal structural rearrangements by genome sequencing. Asian J Androl. 2022;24(3):248.

122. Hu H-y, Wei T-y, Feng Z-k, Li S-j, Zhao R, Yi X-l, et al. Novel Biallelic DNAH1 Variations Cause Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella. DNA Cell Biol. 2021;40(6):833-40.

123. Khan R, Zaman Q, Chen J, Khan M, Ma A, Zhou J, et al. Novel Loss-of-Function Mutations in DNAH1 Displayed Different Phenotypic Spectrum in Humans and Mice. Front Endocrinol. 2021;12.

124. Yang X, Zhu D, Zhang H, Jiang Y, Hu X, Geng D, et al. Associations between DNAH1 gene polymorphisms and male infertility: A retrospective study. Medicine. 2018;97(49).

125. Yu W, An M, Xu Y, Gao Q, Lu M, Li Y, et al. Mutational landscape of DNAH1 in Chinese patients with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella: cohort study and literature review. J Assist Reprod Genet. 2021;38(8):2031-8.

126. OMIM. DPY19-LIKE 2; DPY19L2. Access date: 23 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/613893?search=DPY19L2&highlight=dpy19l2.

127. GeneCards. DPY19L2 Gene - Dpy-19 Like 2. Access date: 23 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DPY19L2&keywords=DPY19L2.

128. Alimohammadi F, Nasab ME, Rafaee A, Hashemi M, Totonchi M, Meybodi AM, et al. Corrigendum to: Deletion of dpy-19 like 2 (DPY19L2) gene is associated with total but not partial globozoospermia. Reprod Fertil Dev. 2020;32(8):805.

129. López-Rodrigo O, Bossini-Castillo L, Carmona FD, Bassas L, Larriba S. Genome-wide compound heterozygote analysis highlights DPY19L2 alleles in a non-consanguineous Spanish family with total globozoospermia. Reprod Biomed Online. 2022.

130. Beurois J, Cazin C, Kherraf Z-E, Martinez G, Celse T, Touré A, et al. Genetics of teratozoospermia: Back to the head. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2020;34(6):101473.

131. Cheung S, Parrella A, Tavares D, Keating D, Xie P, Rosenwaks Z, et al. Single-center thorough evaluation and targeted treatment of globozoospermic men. J Assist Reprod Genet. 2021;38(8):2073-86.

132. Shang Y-L, Zhu F-X, Yan J, Chen L, Tang W-H, Xiao S, et al. Novel DPY19L2 variants in globozoospermic patients and the overcoming this male infertility. Asian J Androl. 2019;21(2):183.

133. Celse T, Cazin C, Mietton F, Martinez G, Martinez D, Thierry-Mieg N, et al. Genetic analyses of a large cohort of infertile patients with globozoospermia, DPY19L2 still the main actor, GGN confirmed as a guest player. Hum Genet. 2021;140(1):43-57.

134. Faja F, Pallotti F, Cargnelutti F, Senofonte G, Carlini T, Lenzi A, et al. Molecular analysis of DPY19L2, PICK1 and SPATA16 in Italian unrelated globozoospermic men. Life. 2021;11(7):641.

135. OMIM. SEPTIN 12; SEPT12. Access date: 23 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/611562?search=SEPTIN12&highlight=septin12#title.

136. GeneCards. SEPTIN12 Gene - Septin 12. Access date: 23 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SEPTIN12&keywords=SEPTIN12.

137. Kuo P-L, Tseng J-Y, Chen H-I, Wu C-Y, Omar HA, Wang C-Y, et al. Identification of SEPTIN12 as a novel target of the androgen and estrogen receptors in human testicular cells. Biochimie. 2019;158:1-9.

138. Geng D, Yang X, Zhang H, Liu X, Yu Y, Jiang Y, et al. Association of single nucleotide polymorphism c. 673C> A/p. Gln225Lys in SEPT12 gene with spermatogenesis failure in male idiopathic infertility in Northeast China. J Int Med Res. 2019;47(2):992-8.

139. Chen H, Li P, Du X, Zhao Y, Wang L, Tian Y, et al. Homozygous Loss of Septin12, but not its Haploinsufficiency, Leads to Male Infertility and Fertilization Failure. Front Cell Dev Biol. 2022;10.

140. Rafaee A, Mohseni Meybodi A, Yaghmaei P, Hosseini SH, Sabbaghian M. Single-nucleotide polymorphism c. 474G> A in the SEPT12 gene is a predisposing factor in male infertility. Mol Reprod Dev. 2020;87(2):251-9.

141. Özkara G, Ersoy Tunali N. SEPTIN12 c. 474 G> A polymorphism as a risk factor in teratozoospermic patients. Mol Biol Rep. 2021;48(5):4073-81.

142. Lai T-H, Wu Y-Y, Wang Y-Y, Chen M-F, Wang P, Chen T-M, et al. SEPT12–NDC1 complexes are required for mammalian spermiogenesis. Int J Mol Sci. 2016;17(11):1911.

143. Kuo P-L, Chiang H-S, Wang Y-Y, Kuo Y-C, Chen M-F, Yu I-S, et al. SEPT12-microtubule complexes are required for sperm head and tail formation. Int J Mol Sci. 2013;14(11):22102-16.

144. Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Namiki M, Horikawa M, et al. Single nucleotide polymorphisms in the SEPTIN12 gene may be associated with azoospermia by meiotic arrest in Japanese men. J Assist Reprod Genet. 2012;29(1):47-51.

145. OMIM. KELCH-LIKE 10; KLHL10. Access date: 23 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/608778?search=KLHL10&highlight=klhl10.

146. GeneCards. KLHL10 Gene - Kelch Like Family Member 10. Access date: 23 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KLHL10&keywords=KLHL10.

147. Yan W, Ma L, Burns KH, Matzuk MM. Haploinsufficiency of kelch-like protein homolog 10 causes infertility in male mice. Proc Natl Acad Sci. 2004;101(20):7793-8.

148. Cannarella R, Condorelli RA, Paolacci S, Barbagallo F, Guerri G, Bertelli M, et al. Next-generation sequencing: toward an increase in the diagnostic yield in patients with apparently idiopathic spermatogenic failure. Asian J Androl. 2021;23(1):24.

149. Rocca MS, Msaki A, Ghezzi M, Cosci I, Pilichou K, Celeghin R, et al. Development of a novel next-generation sequencing panel for diagnosis of quantitative spermatogenic impairment. J Assist Reprod Genet. 2020;37(4):753-62.,

150. Araujo TF, Friedrich C, Grangeiro CP, Martelli L, Grzesiuk J, Emich J, et al. Sequence analysis of 37 candidate genes for male infertility: challenges in variant assessment and validating genes. Andrology. 2020;8(2):434-41.

151. Huang Z, Chen F, Xie M, Zhang H, Zhuang Y, Huang C, et al. The I510V mutation in KLHL10 in a patient with oligoasthenoteratozoospermia. J Reprod Dev. 2021.

152. OMIM. DEAD-BOX HELICASE 25; DDX25. Access date: 24 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/607663?search=607663&highlight=607663.

153. GeneCards. DDX25 Gene - DEAD-Box Helicase 25. Access date: 24 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DDX25&keywords=DDX25.

154. Zhang S, Yang Y, Ma Y, Lin L, Zhang W. Single nucleotide polymorphisms of the gonadotrophin-regulated testicular helicase (GRTH) gene may be associated with the human spermatogenesis impairment. Hum Reprod. 2006;21(3):755-9.

155. Dufau ML, Tsai-Morris C-H. Gonadotropin-regulated testicular helicase (GRTH/DDX25): an essential regulator of spermatogenesis. Trends Endocrinol Metab. 2007;18(8):314-20.

156. Raju M, Hassan SA, Kavarthapu R, Anbazhagan R, Dufau ML. Characterization of the phosphorylation site of GRTH/DDX25 and protein kinase a binding interface provides structural basis for the design of a non-hormonal male contraceptive. Sci Rep. 2019;9(1):1-10.

157. Kavarthapu R, Anbazhagan R, Raju M, Morris C-HT, Pickel J, Dufau ML. Targeted knock-in mice with a human mutation in GRTH/DDX25 reveals the essential role of phosphorylated GRTH in spermatid development during spermatogenesis. Hum Mol Genet. 2019;28(15):2561-72.

158. Kavarthapu R, Anbazhagan R, Sharma AK, Shiloach J, Dufau ML. Linking phospho-Gonadotropin regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25) to histone ubiquitination and acetylation essential for spermatid development during spermiogenesis. Front Cell Dev Biol. 2020;8:310.

159. Tsai-Morris C-H, Koh E, Sheng Y, Maeda Y, Gutti R, Namiki M, et al. Polymorphism of the GRTH/DDX25 gene in normal and infertile Japanese men: a missense mutation associated with loss of GRTH phosphorylation. Mol Hum Reprod. 2007;13(12):887-92.

160. Tsai- Morris CH, Sheng Y, Gutti RK, Tang PZ, Dufau ML. Gonadotropin- regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25): a multifunctional protein essential for spermatogenesis. J Androl. 2010;31(1):45-52.

161. OMIM. LUTEINIZING HORMONE, BETA POLYPEPTIDE; LHB. Access date: 24 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/152780?search=LHB&highlight=lhb.

162. GeneCards. LHB Gene - Luteinizing Hormone Subunit Beta. Access date: 24 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LHB&keywords=LHB.

163. Kalwar Q, Chu M, Ahmad AA, Ding X, Wu X, Bao P, et al. Morphometric evaluation of spermatogenic cells and seminiferous tubules and exploration of luteinizing hormone beta polypeptide in testis of datong yak. Animals. 2019;10(1):66.

164. Ma X, Dong Y, Matzuk MM, Kumar TR. Targeted disruption of luteinizing hormone β-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. Proc Natl Acad Sci. 2004;101(49):17294-9.

165. Lofrano-Porto A, Barra GB, Giacomini LA, Nascimento PP, Latronico AC, Casulari LA, et al. Luteinizing hormone beta mutation and hypogonadism in men and women. N Engl J Med. 2007;357(9):897-904.

166. Achard C, Courtillot C, Lahuna O, Méduri G, Soufir J-C, Lière P, et al. Normal spermatogenesis in a man with mutant luteinizing hormone. N Engl J Med. 2009;361(19):1856-63.

167. OMIM. CATION CHANNEL, SPERM-ASSOCIATED, 1; CATSPER1. Access date: 24 ekim 2021. [Available from: https://omim.org/entry/606389?search=CATSPER1&highlight=catsper1.

168. GeneCards. CATSPER1 Gene - Cation Channel Sperm Associated 1. Access date: 24 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CATSPER1&keywords=CATSPER1.

169. Behvarz M, Rahmani SA, Siasi Torbati E, Danaei Mehrabad S, Bikhof Torbati M. Association of CATSPER1, SPATA16 and TEX11 genes polymorphism with idiopathic azoospermia and oligospermia risk in Iranian population. BMC Med Genomics. 2022;15(1):1-7.

170. Manfrevola F, Ferraro B, Sellitto C, Rocco D, Fasano S, Pierantoni R, et al. CRISP2, CATSPER1 and PATE1 Expression in Human Asthenozoospermic Semen. Cells. 2021;10(8):1956.

171. Hildebrand MS, Avenarius MR, Fellous M, Zhang Y, Meyer NC, Auer J, et al. Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. Eur J Hum Genet. 2010;18(11):1178-84.

172. Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. Ion channels in sperm physiology and male fertility and infertility. J Androl. 2012;33(5):777-88.

173. Heidary Z, Zaki-Dizaji M, Saliminejad K, Khorramkhorshid HR. Expression Analysis of the CRISP2, CATSPER1, PATE1 and SEMG1 in the Sperm of Men with Idiopathic Asthenozoospermia. J Reprod Infertil. 2019;20(2):70.

174. OMIM. NEPHROCYSTIN 4; NPHP4. Access date: 24 ekim 2021. [Available from: https://www.omim.org/entry/607215?search=NPHP4&highlight=nphp4.

175. GeneCards. NPHP4 Gene - Nephrocystin 4. Access date: 24 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPHP4&keywords=NEPHRONOPHTHISIS,4.

176. Won J, de Evsikova CM, Smith RS, Hicks WL, Edwards MM, Longo-Guess C, et al. NPHP4 is necessary for normal photoreceptor ribbon synapse maintenance and outer segment formation, and for sperm development. Hum Mol Genet. 2011;20(3):482-96.

177. Alazami A, Alshammari M, Baig M, Salih M, Hassan H, Alkuraya F. NPHP4 mutation is linked to cerebello- oculo- renal syndrome and male infertility. Clin Genet. 2014;85(4):371-5.

178. OMIM. CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE REGULATOR; CFTR. Access date: 24 ekim 2021. [Available from: https://www.omim.org/entry/602421?search=cftr&highlight=cftr.

179. GeneCards. CFTR Gene - CF Transmembrane Conductance Regulator. Access date: 24 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CFTR&keywords=cftr.

180. Yang L, Ren Z, Yang B, Zhou J, Peng Z, Fang K, et al. The association between variants in the CFTR gene and nonobstructive male infertility: A meta- analysis. Andrologia. 2020;52(2):e13475.

181. Fedder J, Jørgensen MW, Engvad B. Prevalence of CBAVD in azoospermic men carrying pathogenic CFTR mutations- Evaluated in a cohort of 639 non- vasectomized azoospermic men. Andrology. 2021;9(2):588-98.

182. Ghouchanatigh MD, Khan R, Mojarrad M, Hameed U, Zubair M, Waqas A, et al. CFTR mutations causing congenital unilateral absence of the vas deferens (CUAVD) and congenital absence of the uterus (CAU) in a consanguineous family. Asian Journal of Andrology. 2021.

183. Bieniek JM, Lapin CD, Jarvi KA. Genetics of CFTR and male infertility. Transl Androl Urol. 2021;10(3):1391.

184. Asadi F, Mirfakhraie R, Mirzajani F, Khedri A. A survey of the common mutations and IVS8-Tn polymorphism of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in infertile men with nonobstructive azoospermia and CBAVD in iranian population. Iran Biomed J. 2019;23(2):92.

185. McBride JA, Kohn TP, Mazur DJ, Lipshultz LI, Coward RM. Sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection outcomes in men with cystic fibrosis disease versus congenital bilateral absence of the vas deferens. Asian J Androl. 2021;23(2):140.

186. Jiang L, Jin J, Wang S, Zhang F, Dai Y, Shi L, et al. CFTR gene mutations and polymorphism are associated with non-obstructive azoospermia: From case-control study. Gene. 2017;626:282-9.

187. Batiha O, Burghel GJ, Alkofahi A, Alsharu E, Smith H, Alobaidi B, et al. Screening by single-molecule molecular inversion probes targeted sequencing panel of candidate genes of infertility in azoospermic infertile Jordanian males. Hum Fertil. 2021:1-8.

188. OMIM. FK506-BINDING PROTEIN-LIKE; FKBPL. Access date: 24 ekim 2021. [Available from: https://www.omim.org/entry/617076?search=fkbpl&highlight=fkbpl.

189. GeneCards. FKBPL Gene - FKBP Prolyl Isomerase Like. Access date: 24 ekim 2021. [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FKBPL&keywords=fkbpl.

190. Ni B, Lin Y, Sun L, Zhu M, Li Z, Wang H, et al. Low-frequency germline variants across 6p22. 2–6p21. 33 are associated with non-obstructive azoospermia in Han Chinese men. Hum Mol Genet. 2015;24(19):5628-36.

191. Akyuz Sengun D, Guzel Tanoglu E, Ulucan H. A novel mutation in FK506 binding protein-like (FKBPL) causes male infertility. Croat Med J. 2021;62(3):227-32.

192. Sunnotel O, Hiripi L, Lagan K, McDaid JR, De León JM, Miyagawa Y, et al. Alterations in the steroid hormone receptor co-chaperone FKBPL are associated with male infertility: a case-control study. Reprod Biol Endocrinol. 2010;8(1):1-8.

193. Hodžić A, Maver A, Plaseska- Karanfilska D, Ristanović M, Noveski P, Zorn B, et al. De novo mutations in idiopathic male infertility—A pilot study. Andrology. 2021;9(1):212-20.

194. Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the basics of NGS: from mechanism to variant calling. Curr Genet Med Rep. 2015;3(4):158-65.

195. Meera Krishna B, Khan MA, Khan ST. Next-generation sequencing (NGS) platforms: an exciting era of genome sequence analysis. Microbial Genomics in Sustainable Agroecosystems: Springer; 2019. p. 89-109.

196. Yohe S, Thyagarajan B. Review of clinical next-generation sequencing. Arch Pathol Lab Med. 2017;141(11):1544-57.

197. Institute NHGR. DNA Sequencing Costs: Data 2021. Access date: 28 ekim 2021. [Available from: https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data.

198. Kulski J. Next generation sequencing: advances, applications and challenges: BoD–Books on Demand; 2016.

199. Buermans H, Den Dunnen J. Next generation sequencing technology: advances and applications. Biochim Biophys Acta. 2014;1842(10):1932-41.

200. Illumina. Order the NextSeq 550 System. Access date: 31 ekim 2021. [Available from: https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq/order-nextseq-550.html.

201. Illumina. NextSeq 500/550 v2.5 Kits. Access date: 31 ekim 2021. [Available from: https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/cluster-gen-sequencing-reagents/nextseq-series-kits-v2-5.html.

202. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. 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):405-23.

203. Wyrwoll MJ, Köckerling N, Vockel M, Dicke A-K, Rotte N, Pohl E, et al. Genetic Architecture of Azoospermia—Time to Advance the Standard of Care. Eur Urol. 2022.

204. Sarkar S, Sujit KM, Singh V, Pandey R, Trivedi S, Singh K, et al. Array-based DNA methylation profiling reveals peripheral blood differential methylation in male infertility. Fertil Steril. 2019;112(1):61-72. e1.

205. Ayhan Ö, Balkan M, Guven A, Hazan R, Atar M, Tok A, et al. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia. J Med Genet. 2014;51(4):239-44.

206. Hu TY, Zhang H, Meng LL, Yuan SM, Tu CF, Du J, et al. Novel homozygous truncating variants in ZMYND15 causing severe oligozoospermia and their implications for male infertility. Hum Mutat. 2021;42(1):31-6.

207. Kherraf Z-E, Cazin C, Lestrade F, Muronova J, Coutton C, Arnoult C, et al. From azoospermia to macrozoospermia, a phenotypic continuum due to mutations in the ZMYND15 gene. Asian J Androl. 2022;24(3):243.

208. Miyakawa H, Miyamoto T, Koh E, Tsujimura A, Miyagawa Y, Saijo Y, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the SEPTIN12 Gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with sertoli cell–only syndrome. J Androl. 2012;33(3):483-7.

209. Jaiswal D, Trivedi S, Agrawal N, Singh K. Association of the gonadotrophin- regulated testicular RNA helicase gene polymorphism with human male infertility. Andrologia. 2014;46(9):1063-6.

210. Basciani S, Watanabe M, Mariani S, Passeri M, Persichetti A, Fiore D, et al. Hypogonadism in a patient with two novel mutations of the luteinizing hormone β-subunit gene expressed in a compound heterozygous form. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97(9):3031-8.

211. Field PD, Martin NJ. CFTR mutation screening in an assisted reproductive clinic. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2011;51(6):536-9.

212. Chen H, Ruan YC, Xu WM, Chen J, Chan HC. Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility. Hum Reprod Update. 2012;18(6):703-13.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Spermatogenezin genel aşamaları (9) 6
Şekil 2. DNA dizisinin megabaz başına maliyeti (NHGRI)(197) 19
Şekil 3. Genom başına maliyeti (NHGRI)(197) 19
Şekil 4. NextSeq 550 cihazı (200) 35
Şekil 5. NextSeq flowcell, NextSeq kartuşu ve NextSeq buffer kartuşu (201) 35
Şekil 6. Verilerin biyoinformatik analiz akışı 41
Şekil 7. INF4 hastasının patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000492.4(CFTR):c.1521_1523del (p.Phe508del) 42
Şekil 8. INF8 hastasının patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000492.4(CFTR):c.3154T>G (p.Phe1052Val) 42
Şekil 9. INF19 hastasının olası patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_173628.4(DNAH17):c.7752+2T>A 43
Şekil 10. INF21 hastasının patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000492.4(CFTR):c.1521_1523delCTT (p.F508del) 43
Şekil 11. INF22 hastasının olası patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000894.3(LHB):c.169T>C (p.Tyr57His) 44
Şekil 12. INF23 hastasının olası patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000894.3(LHB):c.169T>C (p.Tyr57His) 44
Şekil 13. INF28 hastasının patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000492.4(CFTR):c.350G>A (p.R117H) 45
Şekil 14. INF29 hastasının patojenik varyantının IGV görüntüsü- NM_000492.4(CFTR):c.1397C>T (p.S466L) 45

Şekil 15. INF33 hastasının olası patojenik varyantının IGV görüntüsü-NM_000492.4(CFTR):c.3872A>G (p.Q1291R)..... 46
Şekil 16. INF37 hastasının olası patojenik varyantının IGV görüntüsü-NM_173812.5(DPY19L2):c.247C>T (p.Q83*)..... 46
Şekil 17. INF37 hastasının patojenik varyantının IGV görüntüsü-NM_000492.4(CFTR):c.1521_1523delCTT (p.F508del)..... 47

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Azosperminin etiyolojisi....10
Tablo 2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler....23
Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar....24
Tablo 4. Çalışılan genler ve bilgileri....25
Tablo 5. Fragmentasyon PCR içerikleri ve miktarları....26
Tablo 6. Fragmentasyon PCR koşulları....27
Tablo 7. Adaptör ligasyonu içerikleri ve miktarları....27
Tablo 8. Hedef zenginleştime PCR içerikleri ve miktarları....29
Tablo 9. Hedef zenginleştirme PCR koşulları....30
Tablo 10. Universal PCR içerikleri ve miktarları....31
Tablo 11. Universal PCR koşulları....31
Tablo 12. ILMN DNA standartları 5 seri dilüsyon miktarları....32
Tablo 13. Örnekler için hazırlanacak olan 3 dilüsyon miktarları....33
Tablo 14. SYBR Green PCR içerikleri ve miktarları....33
Tablo 15. Rotor gene real time PCR koşulları....34
Tablo 16. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ve cinsiyet bilgileri....40
Tablo 17. VUS, olası patojenik ve patojenik varyantların saptandığı hastaların analiz sonuçları, genotipleri, patojeniteleri, ACMG-2015 skorları, ClinVar, dbSNP, OMIM fenotip uyumu....48
Tablo 18. Varyantlara ait genotip ve in sliko tahmin skorları (PolyPhen, SHIFT, DANN skoru ve CADD Skoru)....49

ÖZGEÇMİŞ

Mersin'de doğdum. Yakın Doğu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde İngilizce program %100 burslu olarak lisans eğitimimi tamamladım. Aynı yıl içinde Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Ana-bilim Dalı'nda özel öğrenci statüsü ile yüksek lisans eğitimime başladım.

Yayınlar

1) Aydin, C., & Kalkan, R. (2020). Cancer treatment: an epigenetic view. Global medical genetics, 7(01), 003-007.

EKLER

Ek 1. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi Yeni Nesil Dizileme ile Çalışılan Testler İçin Aydınlatılmış Onam Formu

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENETİK HASTALIKLAR DEĞERLENDİRME MERKEZİ
YENİ NESİL DİZİLEME İLE ÇALIŞILAN TESTLER İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Yeni Nesil Dizileme testi ile bir seferde birden çok hastalığa ait bilgiler elde edilebilmektedir. Bu çalışma ile sizin ya da çocuğunuzun hastalığına neden olabilecek genetik faktörleri araştırmayı hedefledik. Amacımız hastalığınıza doğru tanı koymak ve ileride daha etkin tedavi yöntemlerinin gelişmesine katkıda bulunabilmektir.

Bu çalışma sonucunda kendinizde bu hastalık görülmese bile hastalığa yol açabilecek genleri taşıdığınız ve çocuğunuza kalıtmış olduğunuz ortaya çıkabilir. Bu bilgileri size bildirebiliriz. Bilgi edinmek istemiyor iseniz lütfen yazılı formun altında belirtiniz. Bu risklere ek olarak örneğinizde tüm genom bilgilerinizin elde edileceği geniş ölçekli bir analiz yapılması da gerekli olabilir. Bu analiz sonucunda çocuğunuz/ailenizdeki bu hastalık dışında başka hastalıklar için taşıyıcı olduğunuz ya da ileride bu tarz hastalıkları geliştirebileceğiniz bilgisi edinilebilir. Buna ek olarak bazı hastalıklara yatkınlık yaratan genom değişikliklerini de taşıdığınız saptanabilir. Bu bilgilerin büyük bir kısmı henüz klinik önemi ispatlanmamış araştırma düzeyinde olan bilgilerdir. Bu nedenle klinik önemi olduğu kesinlik kazanmış olan bilgileri size ileteceğiz. Elde edilecek olan diğer bilgiler, onay vermeniz halinde kimlik bilgileriniz yer almadan veri bankalarına eklenerek araştırıcıların kullanımına açılabilir, süresiz olarak saklanabilir ve başka araştırmalarda kullanılabilir. Yapılacak olan bu araştırmalar hastalıkların yapısının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. Bu veriler bazı dizi değişikliklerinin hastalık yapıcı etkisinin olup olmadığına yönelik çok değerli bilgiler sağlayacak ve böylelikle hastalığına tanı konmasını bekleyen sayısız insana katkı sağlamış olacaktır Lütfen yazılı formun altındaki seçeneklerden sizin/çocuğunuzun klinik ve genetik bilgilerinin veri bankalarına eklenerek başka araştırmalarda kullanılmasına onay verip vermediğinizi belirtiniz.

Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar saklanabilir ve başka genetik araştırmalarda örneğin kontrol örneği olarak kullanılabilir. Lütfen yazılı formun altındaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyerek bu konudaki görüşünüzü belirtiniz.

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir. Sizinle ilgili tıbbi bilgiler kimlik belirtilmeden tıp öğrencilerinin eğitiminde veya bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçlar dışında kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Katılımcının Beyanı

Yapılması istenen genetik araştırma hakkında bana bilgi verildi. İstediğim zaman araştırmadan çekilebileceğimi biliyorum. Çalışmaya katılımımın tamamen gönüllü olduğu, katılmam ya da katılıp daha sonra çalışmadan çekildiğim durumda tedavi ve tetkiklerimin bundan etkilenmeyeceği belirtildi. Bu çalışmaya kendi gönüllü onayım ile kendimin /çocuğumun katılmasına olurum vardır.

Katılımcı	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza
Veli/Vasi	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza
Hekim:	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza

Görüşme tarih ve saati: :

Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri,
□ Öğrenmek istiyorum
□ Öğrenmek istemiyorum

□ Tarafımdan alınan isimsiz saklanacak örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

□ Tarafımdan alınan isimsiz saklanacak örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi'nde yapılacak genetik testlerim için gerekli poliklinik kayıtlarının yapılmasını şahsen sağlayacağımı, bu kayıtlar tamamlanmadığı sürece genetik test sonuçlarımı teslim alamayacağımı teyit ediyorum.

□ ONAYLAMIYORUM

□ ONAYLIYORUM

Ek 2. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulunun 26.04.2021 tarih, 10/21 karar numarası ve sayılı belgesi (TÜTF-BAEK 2021/210)

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2021/210	
	PROTOKOL ADI	Non-Obstrüktif Azospermik (NOA) İnfertil Hastalarda Yeni Nesil Dizi Analizi (NGS) ile Genetik Etiyolojinin Araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Dr. Öğr. Üyesi Emine İkbal ATLI	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:10/21**		**Tarih:26.04.2021**
	Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Emine İkbal ATLI'nın sorumluluğunde yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gülsüm ÖNAL Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Hakan GÜRKAN Başkan Yardımcısı	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Selçuk KORKMAZ Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Mehmet Erdal VARDAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Galip EKUKLU Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Filiz TÜTÜNCÜLER KÖKENLİ Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E H	E H	
Öğr. Gör. Dr. Sinan ATEŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Serhat OĞUZ Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Avukat Emine NURLU Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E H	E H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a.
Dekan Yrd.