T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİTOKONDRİYAL DNA'NIN KONTROL BÖLGESİNDEKİ OLASI NON-CpG METİLASYONLARIN SPERM HAREKETİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa ABUSAK

DANIŞMAN
Prof. Dr. İlhan ONARAN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Programı

Mayıs, 2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Mustafa ABUSAK tarafından, **Prof. Dr. Prof. Dr. İlhan ONARAN** danışmanlığında hazırlanan **" MİTOKONDRİYAL DNA'NIN KONTROL BÖLGESİNDEKİ OLASI NON-CPU METİLASYONLARİN SPERM HAREKETİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI"** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **10/02/2023** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	**Sonuç**
DANIŞMAN	Prof. Dr. İlhan Onaran İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Mehmet Güven İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Fahri Akbaş Bezmiâlem Vâkıf Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Yasemin Müşteri Oltulu Biruni Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Ahmet Özaydın İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret

BÜTÇE DESTEKLERİ

MİTOKONDRİYAL DNA'NIN KONTROL BÖLGESİNDEKİ OLASI NON-CpG METİLASYONLARİN SPERM HAREKETİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 36175

TEŞEKKÜR

Tezimi tamamlamış olmaktan dolayı büyük bir memnuniyet duyuyorum. Benim bu başarıma ulaşmamda öncelikle lisansüstü çalışmalarımı boyunca bana destek veren Danışman hocama sayın Prof. Dr. İlhan ONARAN teşekkür etmek istiyorum. Tezimin hazırlanma sürecinde, benimle birlikte sabırla çalışarak beni yönlendirdiğiniz için ve zaman ayırarak herhangi bir sorumla ilgilendiğiniz için teşekkür ederim. Ayrıca, araştırmalarımı ilerletmek için değerli önerilerinizi paylaştığınız için minnettarım.

Ayrıca yüksek lisansta geçirdiğim süre boyunca bana yol gösteren, laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan ve tezim hazırlamasında büyük emek veren Dr. Ayla KARİMOVA'ya teşekkür etmek istiyorum.

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa'da birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım ve onlarla güzel vakit geçirdiğim olan bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak beni yetiştiren hayatta başarılı olmam için bana her fırsatı sağlamak için uğraşan aileme teşekkür ederim. Sizlerin beni teşvik etmesi, motive etmesi ve benimle gurur duyması benim için çok önemliydi. Sizlerin desteği olmadan, tezimi tamamlamak mümkün olmazdı.

Mayıs 2023 Mustafa ABUSAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

BEYAN ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **iv**
TEŞEKKÜR ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vi**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **3**
2.1. ERKEK İNFERTİLİTESİNE GENEL BAKIŞ **3**
2.1.1. Spermatozoa Motilite Bozuklukları 3
2.2. MİTOKONDRİ **4**
2.2.1. Mitokondrinin Kökeni ve Yapısı 5
2.2.2. Mitokondriyal Metabolizma 6
2.2.3. Mitokondriyal genom ve nükleoid 7
2.3. MİTOKONDRİYAL D-LOOP **9**
MtDNA D-loop'un İşlevi Nedir? 9
2.4. MİTOKONDRİYAL DNA REPLİKASYONU **10**
2.3.1. mtDNA Replikasyonu Modelleri: 11
2.5. MİTOKONDRİYAL DNA'NIN TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYONU: **11**
2.4.1. Transkripsiyon 11
2.4.2. Mitokondriyal protein sentezi 12
2.6. ATP ÜRETİMİ VE MİTOKONDRİ **14**
2.6.1. Spermatozoa Hücresinde ATP Üretimi 14
2.7. DNA METİLASYONU VE MİTOKONDRİYAL DNA METİLASYONU **15**
2.7.1. CpG Metilasyonu 15
2.7.2. Non-CpG Metilasyonu 16
2.7.3. mtDNA Metilasyonu 17
3. GEREÇ VE YÖNTEM **20**
3.1. Çalışma Grubu 20
3.2. Spermatozoa İzolasyonu 21

3.3. ATP Düzeylerinin Belirlenmesi (Biolüminesans) 21
3.4. Protein Miktar Tayini (Lowry-Hartree Modifiye Yöntemi) 21
3.5. DNA Izolasyonu 22
3.6. DNA Bisülfit Modifikasyonu 22
3.7. Mitokondriyal DNA D-loop CpG Metilasyon açısından değerlendirilmesi 22
3. 8. Mitokondriyal DNA D-loop Non-CpG Metilasyon açısından değerlendirilmesi 24
3.9. Mitokondri DNA Kopya Sayısının Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi 26
3.10. İstatiksel Analiz 26
4. BULGULAR **28**
4.1. Progresif Motilite % 28
4.2. Spermatozoa Hücre İçi ATP Düzeyleri 29
4.3. mtDNA D-loop CpG Metilasyon % Miktarlarının Eş Zamanlı PZR Analizi 30
4.4. mtDNA D-loop Non-CpG metilasyon% Miktarlarının Eş Zamanlı PZR Analizi 31
4.5. mtDNA Kopya Sayısının Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi 32
4.6. Progresif Motilite Yüzdesi ile mtDNA D-loop CpG Metilasyon Yüzdesi Arasındaki Korelasyon Analizi 33
5. TARTIŞMA **34**

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 Mitokondrinin bileşenleri (A, B) 6
Şekil 2: Mitokondriyal DNA (mtDNA) ve D-loop bölgesi..... 8
Şekil 3: İnsan mitokondriyal NCR ve D döngüsünün ayrıntılı yapısı. 10
Şekil 4. CpG ve Non-CpG metilasyonu. 17
Şekil 6. Astenozoospermi ve kontrol gruplarina ait Progresif Motilite yüzdesi. 28
Şekil 7: Astenospermi ve kontrol gruplarında ait spermatozoa mitokondri ATP seviyeleri.. 29
Şekil 8: Astenospermi ve kontrol gruplarının mitokondri D-loop metilasyon oranı 30
Şekil 9 . Astenospermi ve kontrol guruplarına ait mitokondri D-loop bölgesinin non-CpG metilasyon seviyeleri..... 31
Şekil 10: spermatozoasındaki mtDNA kopya sayısı..... 32
Şekil 11. Astenozoospermi ve kontrol guruplarina ait progresif motilite yüzdesi ile mtDNA D-loop CpG Metilasyon Yüzdesi arasındaki korelasyonlarının analizi..... 33

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Spermatozoa Motilite Bozuklukları..... 3
Tablo 2: Spermatozoada ATP üretim yolu ve işlevleri..... 14
Tablo 3..... 24
Tablo 4: Primer dizisi ve elde edilecek ürün miktarı..... 25
Tablo 5..... 26

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
ATP:	Adenozin trifosfat
bç:	Baz çifti
CFTR:	Kistik fibrozis transmembran regülatör
CpG:	Sitozin-fosfat-guanin
CSBI-III :	Conserved Sequence Blocks
dk:	Dakika
GAPDS:	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz-S
GLUTs:	Glukoz taşıyıcıları
IM:	İmmotilite (Hareketsiz)
LH:	Luteinizan Hormon
M:	Mol
MD-EEA:	Metilasyona Duyarlı Erime Eğrisi Analizi
mM:	Milimol
ml:	Mililitre
mtSSB:	mitochondrial single stranded DNA-binding protein
nm:	Nanometre
NP:	Non-progresif motilite (Yerinde hareket)
PBS:	Phosphate-buffered saline (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi)
PR:	Progresif motilite (İleri hareket)
PZR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
ROS:	Reaktif oksijen türleri
sn:	Saniye
TAS:	Termination Associated Sequences
Top1mt:	Mitokondriyal topoizomeraz
TRUS:	Transrektal ultrasonografi
µl:	Mikrolitre
VAP:	spermatozoanın ortalama yol hızı.

VCL : spermatozoanın eğrisel hızı.

VSL: spermatozoanın düz çizgi hızı.

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİTOKONDRİYAL DNA'NIN KONTROL BÖLGESİNDEKİ OLASI NON-CpG METİLASYONLARİN SPERM HAREKETİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa ABUSAK

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Programı

Danışman : Prof. Dr. İlhan ONARAN

Amaç: Erkek infertilitesinin önemli nedenlerinden biri olan spermatozoa motilite bozukluğunun altında yatan patolojilerden birinin de yeterli enerjinin üretilememesi olduğu öne sürülmektedir. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan temin edilen adenozin trifosfat (ATP) bu enerjinin bir bölümünü temin etmektedir. Son yıllardaki çalışmalar, mitokondri genomunda yer alan transkripsiyon kontrol bölgesindeki CpG ve non-CpG olarak yer alan bazların metillenmiş sitozin seviyelerindeki değişikliklerin bazı patolojilerle ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu tür değişikliklerin erkek infertilitesi ile ilişkili olup olmadığı bilinmediğinden, bu tez çalışmasında ilgili bölgenin CpG ve non-CpG metilasyon seviyesi ve bunun spermatozoa hareketi ile ilişkisi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem : İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Androloji Polikliniği'ne başvuran 25 astenospermik ve 24 kontrol (normospermik) vaka olmak üzere toplam 49 spermatozoa örneği çalışmaya dahil edildi. Semen

örneklerinden elde edilen spermatozoaların DNA'larından bisülfit modifikasyon sonrası mtDNA D-loop promotör bölgesi CpG metilasyon düzeyleri Metilasyona Duyarlı Erime Eğrisi vasıtasıyla analiz edildi. Non-CpG metilasyon durumunu belirlemek için Non-CpG adalarına özgül metile ve unmetile bölgeleri çoğaltmaya yönelik primer dizileri tasarlandı. İlgili bölgelerin metilasyon miktarı Eş Zamanlı PZR yöntemiyle belirlendi. Sonrasında elde edilen veriler ve spermatozoa parametreleri ile metilasyon düzeyleri arasındaki ilişkiler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: sonuçlarımız, astenospermik vakalara ait spermatozoa mtDNA'sındaki D-loop bölgesinde yer alan CpG adacıklarının metilasyon düzeylerinin kontrol grubuna göre 1,9 kat daha fazla olduğunu göstermektedir. Ancak aynı bölgedeki non-CpG adacıklarındaki metilasyon düzeyleri, ikili karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). İlgili parametreler için değişkenlik katsayıları yüksek hesaplanmıştır. Bulgularımız, Spearman's Rho testi analizi ile astenozoospermi ve kontrol gruplarına ait spermatozoa progresif motilite yüzdesi ile mtDNA D-loop bölgesi sitozin metilasyon yüzdesi arasında korelasyon olmadığını gösterdi.

Sonuç: Çalışmamızın bulguları **a**stenospermisi olan infertil vakalardan elde edilen spermatozoalarının mitokondri genomunda yer alan transkripsiyon kontrol bölgesindeki Non-CpG adacıklarından ziyade CpG adacıklarındaki sitozinlerin metilasyon seviyelerinde bir artış olduğunu göstermiştir. Parametrelerde gözlemlenen bireysel farklılıkların nedenleri, iki bölgedeki profil farklılıkları ve mekanizma ile ilişkili diğer komponentlerin rolünü ortaya çıkartacak çalışmaların spermatozoa hareket bozuklarının mekanizmalarının açıklanmasına katkıda bulanabileceği görüşündeyiz.

Mayıs 2023 , 2 sayfa.

Anahtar kelimeler: Mitokondri, Non-CpG metilasyon, Astenospermisi, Epigenetik

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

Investigation of the Effect of Possible Non-CpG Methylations in the Control Region of Mitochondrial DNA on Sperm Movement

Mustafa ABUSAK

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Medical Biology Programme

Supervisor : Prof. Dr. İlhan ONARAN

Objective: It is suggested that one of the significant causes of male infertility, sperm motility disorder, is due to the inability to produce sufficient energy. Adenosine triphosphate (ATP) obtained from mitochondrial oxidative phosphorylation provides a portion of this energy. Recent studies have shown that changes in the levels of methylated cytosines in CpG and non-CpG bases in the transcription control region of the mitochondrial genome are associated with some pathologies. As it is unknown whether such changes are related to male infertility, this thesis investigates the CpG and non-CpG methylation levels of the relevant region and their relationship with sperm motility.

Materials and Methods: A total of 49 sperm samples were included in the study, consisting of 25 asthenospermic and 24 control (normospermic) cases, who applied to the Andrology Clinic of the Department of Urology, Istanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine. CpG methylation levels of the mtDNA D-loop promoter region were analysed through Methylation-Sensitive High-Resolution Melting Curve Analysis from the DNA of the

sperm obtained from the semen samples after bisulfite modification. Primer sequences were designed to replicate the specific methylated and unmethylated regions of Non-CpG islands to determine the non-CpG methylation status. The methylation levels of the relevant regions were determined by the Simultaneous PCR method. Subsequently, the relationships between the obtained data, sperm parameters, and methylation levels were statistically evaluated. Results: According to the results of the studies, Non-CpG methylation increase is observed in the D-loop region in asthenosperm disease spermatozoa. When we look at the results of our study, there was an increase in mtDNA methylation in diseased spermatozoa compared to normal spermatozoa, but it shows that it is not related to ATP concentration.

Results: Our results showed that the CpG island methylation levels in the mtDNA D-loop region of spermatozoa in asthenospermic cases were 1.9 times higher than those in the control group. However, the methylation levels in the non-CpG islands in the same region were not statistically significant in the pairwise comparison ($p>0.05$). The variability coefficients were also found to be high for the relevant parameters. Our findings showed no correlation between progressive motility percentage of spermatozoa and cytosine methylation percentage in the mtDNA D-loop region for both asthenozoospermic and control groups, according to Spearman's Rho test analysis.

Conclusion: Our study findings have shown an increase in the methylation levels of CpG sites rather than non-CpG sites in the transcription control region of the mitochondrial genome in spermatozoa obtained from infertile cases with asthenospermia. The reasons for the observed individual differences in the parameters may contribute to explaining the mechanisms of spermatozoa motility disorders, revealing the differences in profiles between the two regions and the role of other components related to the mechanism. We believe that further studies can shed light on this matter.

May 2023, 2 pages.

Keywords: Mitochondria, Non-CpG methylation, Asthenospermia, Epigenetics,

1. GİRİŞ

Erkek infertilitesinin önemli nedenlerinden biri olan ve spermatozoa motilite bozukluğu olarak tanımlanan astenospermi sebepleri arasında ATP üretimindeki sorunlar da yer almaktadır. Spermatozoa hücrelerinde üretilen ATP, çeşitli fonksiyonlarda olduğu gibi spermatozoa hareketi için de gereklidir. Dolayısıyla mitokondrinin biyoenerjisi, erkek infertilitesinde son derece önemlidir. Bazı çalışmalar, mitokondriyal genomdaki mutasyonların astenospermi ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Mitokondriyal genler arasında oksidatif fosforilasyonu kontrol eden 13 gen bulunur ve bunların ekspresyon seviyeleri D-loop adı verilen bölge tarafından gerçekleştirilir. D-loop bölgesindeki metilasyonların, son yıllarda yapılan araştırmalar sonucu, gen ifadesinin düzenlenmesi başta olmak üzere birçok süreçte epigenetik bir belirteç olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur.

Bu bölgedeki CpG adacıklarındaki metilasyon değişiklikleri, bazı nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Bu bölgede aynı zamanda, Non-CpG metilasyon bölgeleri, CpG dizileri dışındaki bölgelerde de bulunur ve bazı araştırmacılar bu metilasyonun değişikliklerinin gen ekspresyonu ve doku özgüllüğü ile ilişkili olduğunu belirtmektedir.

Nüklear genoma ait bazı genlerin anormal DNA metilasyonu, zayıf spermatozoa kalitesi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca oligoastenozoospermi ve astenozoospermi vakalarında da nDNA'sında anormal metilasyon gözlenmiştir. Her ne kadar nDNA epigenetiği hakkında birçok çalışma mevcut olmasına rağmen, mitokondriyal DNA epigenetiğiyle ilgili araştırmalar son yıllarda ilgi görmeye başlamıştır. Astenospermi durumundaki motilite bozukluğunun ATP'ye bağımlılığı göz önüne alındığında, D-loop veya mtDNA genlerinin CpG bölgelerindeki metilasyon artışının, ATP seviyelerini kritik bir noktaya getirerek söz konusu patolojiden sorumlu olabileceği öngörülebilir.

Pubmed ve Web of Science veri tabanları üzerinde yaptığımız literatür taraması, mtDNA ve D-loop bölgesindeki metilasyon ile erkek infertilite arasındaki doğrudan bir ilişkiyi açıklayan bir makale bulunmadığını göstermiştir. Bu nedenle, bu tez projesi mtDNA D-loop bölgesindeki metilasyon seviyesi ile spermatozoa hareketi arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçlamaktadır. Bu çalışmanın sonuçları, infertilite ve astenospermi patogenezinde mtDNA'nın epigenetik rolünü anlamak için önemli bir ipucu sağlayabilir.

.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. ERKEK İNFERTİLİTESİNE GENEL BAKIŞ

Spermatozoa anormallikleri erkek kısırlığında kritik bir faktördür. Bu anormallikler şunları içerir:

Sperm Sayısı İle İlgili Anormallikler

Azospermi: Seminal plazmada sperm yokluğu

Düşük spermatozoa sayısı (oligozoospermi: <15 milyon spermatozoa/mL) (Cooper TG, 2010).

Spermatozoa Motilitesi İle İlgili Anormallikler

Spermatozoanın servikal mukustan verimli geçişi, hızlı ilerleyici motiliteye, (L., 2010) (C., 1974), yani en az 25 μm/sn'lik bir ileri progresyona sahip spermatozoaya bağlıdır. Normal bir spermatozoa analizi, en az %40 A ve B, ilerleyici hareketli spermatozoalar içermelidir. Kalıcı zayıf motilite, döllenmedeki başarısızlığın bir göstergesidir (Aitken RJ, 1985).

Anormal Sperm Yapısı ve Şekli (Teratozoospermi)

Spermlerin morfolojisi için, yaymalar WHO sınıflandırması veya Kruger' in katı kriterler sınıflandırması kullanılarak puanlanabilir (Aitken RJ, 1985). Morfoloji, klinik sonuçları belirlerken izole bir parametre olarak değil, diğer parametrelerle birlikte kullanılmalıdır (Van Waart J, 2001).

2.1.1. Spermatozoa Motilite Bozuklukları

Astenozoosperminin etiyolojisinde mitokondrinin rolü tam olarak anlamadık çünkü bu patolojinin birçok vakasının nedeni hala bilinmemektedir. Bununla birlikte, farklı metodolojik yaklaşımlar kullanarak, birkaç yazar, hem idiyopatik hem de varikosel ile ilişkili astenozoospermi vakalarında mitokondriyal solunum aktivitesinde kusurların varlığını göstermiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Spermatozoa Motilite Bozuklukları

Yazarlar	Yöntem	Sonuç	Klinik çıkarımlar
Evenson *et al.*, 1982	Mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi (Aψm)	Azaltmış Aψm	Astenozaospermi
Ruiz-pesini *et al.*, 1998	Spektrofotometrik testi ile enzimatik aktivitenin belirlenmesi	Kompleks I, II ve IV ile sitrat sentazın aktivitesi azaltmış	Astenozaospermi
Ruiz-pesini *et al.*, 2000	Spektrofotometrik tahlil ile enzimatik aktivitenin belirlenmesi	Sitrat sentazın Kompleks II'sinin aktivitesi azaltmış	Oligozoospermia
Marchetti et al., 2002	Mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi (Aψm)	Azaltmış Aψm	Astenozaospermi
Ferramosca *et al.*, 2008	Oksijen tüketiminin polarografik testi ile belirlenmesi	Solunum kontrol oranının azaltması	Astenozaospermi

Astenozoospermi de dahil olmak üzere spermatozoa motilitesi ve patolojik yönleri gerçekten mitokondriyal işlevsellik ile ilişkiliyse, mitokondriyal genomdaki (mtDNA) mutasyonların spermatozoa fizyolojisini etkileyebileceği beklenmelidir. Gerçekten de, mtDNA, gerekli tRNA'larla birlikte mitokondriyal ATP üreten yolun 13 polipeptit alt birimini kodlar (Anderson, 1981). Mitokondriyal solunum kompleksleri I, III ve IV'ün bazı alt birimleri mitokondriyal genom tarafından kodlanır. Diğer bileşenler nükleer genom tarafından kodlanır. Mitokondri içindeki içeriğinin tek veya çoklu olarak silinmesi veya hatta modifikasyonları gibi mtDNA değişiklikleri, spermatozoa hareketliliğinde bir azalmaya ve sonuç olarak doğurganlığın bozulmasına neden olur (Folgerø, 1993). Ayrıca, bazı insan mtDNA varyantlarının mitokondriyal OXPHOS'un azalmasından ve dolayısıyla spermatozoa hareketliliğinin azalmasından sorumlu olduğu öne sürülmüştür (Montiel-Sosa, 2006). Mitokondriyal genomdaki değişikliklerin motilite de dahil olmak üzere birçok spermatozoa fonksiyonunu tehlikeye atabileceği sonucuna dair büyük bir fikir birliği bulunmuştur.

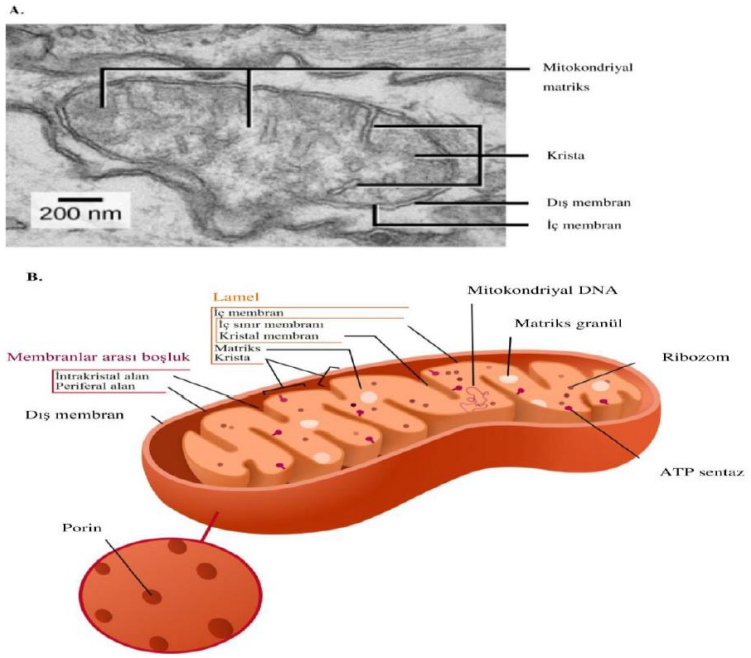
2.2. MİTOKONDRİ

Mitokondri, çoğu ökaryotik hücrede bulunan hücre organellerinden biridir. Bu yapılar, hücrede gerekli olan adenozin trifosfatın (ATP) çoğunu ürettikleri için genellikle hücrenin "güç santralleri" olarak adlandırılır. Bu amaçla mitokondri, solunum zinciri, sitrik asit döngüsü ve β-oksidasyon için gerekli enzimler gibi enerji metabolizmasında yer alan temel enzim sistemlerini içerir. Mitokondri ayrıca çoklu kopyalarda bulunan kendi genomunu da içerir. Mitokondriyal DNA (mtDNA), solunum zincirindeki bazı proteinleri ve bu proteinlerin mitokondri içinde translasyonunda yer alan RNA moleküllerini kodlayan küçük dairesel bir moleküldür. Mitokondriyal fonksiyon için gerekli olan diğer tüm bileşenler nükleer genom tarafından kodlanır ve mtDNA replikasyonu için gerekli faktörleri içerir (Lang, 1999) (Gray, 1999).

Mitokondriyal disfonksiyona bağlı çok sayıda insan genom bozukluğu ile vurgulanır. Bu bozuklukların çoğu, genellikle mtDNA replikasyonu ya da transkripsiyonu sonucunda yer alan proteinlerdeki genetik kusurların neden olduğu kusurlu mtDNA'nın bir sonucudur. Bu çalışmada, mitokondride D-loop içerisinde Non-CpG metilasyonun etkisine odaklanarak spermatozoain hareketini nasıl etki ettiğini araştırıldı. Yapılan bu çalışma mtDNA'nın daha derin bir şekilde anlaşılmasına katkıda bulunmuştur ve bu süreci etkileyen insan genom bozuklukları üzerine gelecekteki çalışmalar için gelecek vaat etmektedir (Veziers, 1999).

2.2.1. Mitokondrinin Kökeni ve Yapısı

Ökaryotik hücrenin evrimi, enerji üreten bir organel olan mitokondrinin gelişimini içeriyordu. Mitokondrinin bakterilerle benzerlikler gösterdiğinin gözlemlenmesi ve mitokondrinin kendi genomunu içerdiğinin keşfi (Veziers, 1999) bilim adamlarını endosimbiyotik teori hipotezini önermeye yöneltmiştir (Margulis, 1981). Endosimbiyotik teori, yaklaşık 2 milyar yıl önce eski bir α-proteobakterinin bir arkebakteri (metanojen) ile kaynaştığını öne sürer (Gray, 1999).



Şekil 1 Mitokondrinin bileşenleri (A, B)
(https://lol.khanacademy.org/science/biology/structure-of-a_cell/tour-of-organelles/a/chloroplasts-and-mitochondria,)

Elektron mikroskobu ile mitokondrinin incelenmesiyle, mitokondrinin bir dış zar ve kıvrımlı bir iç zar olmak üzere iki zarı olduğu ortaya çıktı (Şekil 1). Kas hücreleri ve nöronlar gibi krista sayısı ve morfolojisinin hücrenin enerji talebini yansıttığı öne sürülmüştür. Bu hücreler daha büyük iç mitokondriyal membran yüzeyi, daha yüksek solunum kapasitesi ile sonuçlanabilir ve daha fazla solunum zinciri kompleksine katkıda bulunabilir (J., 2008).

Mitokondrinin morfolojisi, farklı hücre tipleri ve organizmalar arasında değişir. Hepatositlerde ve fibroblastlarda mitokondri, 3-4 μm (uzunluk) ve yaklaşık 1 μm (çap) boyutlarında tipik bir şekle sahiptir. Hücre başına düşen mitokondri sayısı, farklı hücre tipleri arasında değişmektedir ve farklı hücrelerden alınan kesitlerde hücre başına düşen mitokondri sayısının, birkaç yüz ile birkaç bin arasında olduğu tahmin edilmektedir (Scheffler, 2008).

2.2.2. Mitokondriyal Metabolizma

1. Oksidatif fosforilasyon

Mitokondriler, ökaryotik bir hücrede gerekli olan ATP'nin çoğunu ürettiği için genellikle hücrenin güç santralleri olarak adlandırılır. Bu işlemlerin gerçekleştiği mekanizmaya oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) denir. Elektron, elektron taşıyıcıları ile O_2'ye aktarılır ve ardından ATP üretimi gerçekleşir. Elektronların kaynağı, sitrik asit döngüsü (trikarboksilik asit döngüsü veya Krebs döngüsü) tarafından üretilen indirgenmiş NADH ve $FADH_2$

moleküllerdir. NADH ve $FADH_2$, yüksek transfer potansiyeline sahip elektronlar içerir ve bu moleküller tarafından bağlanan elektronlar, mitokondriyal iç zarda bulunan elektron taşıma zincirine aktarılır, bu da protonların mitokondriyal matristen zarlar arası boşluğa hareketi ile sonuçlanır. Bu mekanizma, protonların akışını ATP sentaz yoluyla matrikse geri yönlendiren, aynı zamanda bir proton-hareket kuvveti olarak da adlandırılan bir proton gradiyenti oluşturur. Bu adımda ADP'den ATP üretilir.

2. Sitrik asit döngüsü ve diğer metabolik yollar

Sitrik asit döngüsü, glikozun CO_2'ye oksidasyonunu sağlar. Glikoliz ile üretilen pirüvat, mitokondriye taşınır ve Asetil CoA'ya dönüştürülür. Asetil CoA, farklı enzimatik adımlarda CO_2, GTP ve elektron taşıyıcıları (NADH ve $FADH_2$) üreten sitrik asit döngüsü için yakıttır. Ayrıca, sitrik asit döngüsünün ara maddeleri, nükleotid bazları ve amino asitler gibi biyomoleküller için yapı taşlarıdır.

Mitokondriyal matriks aynı zamanda yağ asitlerinin parçalanma yeridir. Yağ asitleri mitokondriye taşınmadan önce aktive edilir ve β-oksidasyon adı verilen bir mekanizma ile parçalanır. β-oksidasyon, elektronları doğrudan elektron taşıma zincirine aktaran NADH ve $FADH_2$ moleküllerini üretir, ayrıca sitrik asit döngüsüne giren ve daha fazla indirgeyici maddenin üretimine katkıda bulunan Asetil CoA'yı üretir.

2.2.3. Mitokondriyal genom ve nükleoid

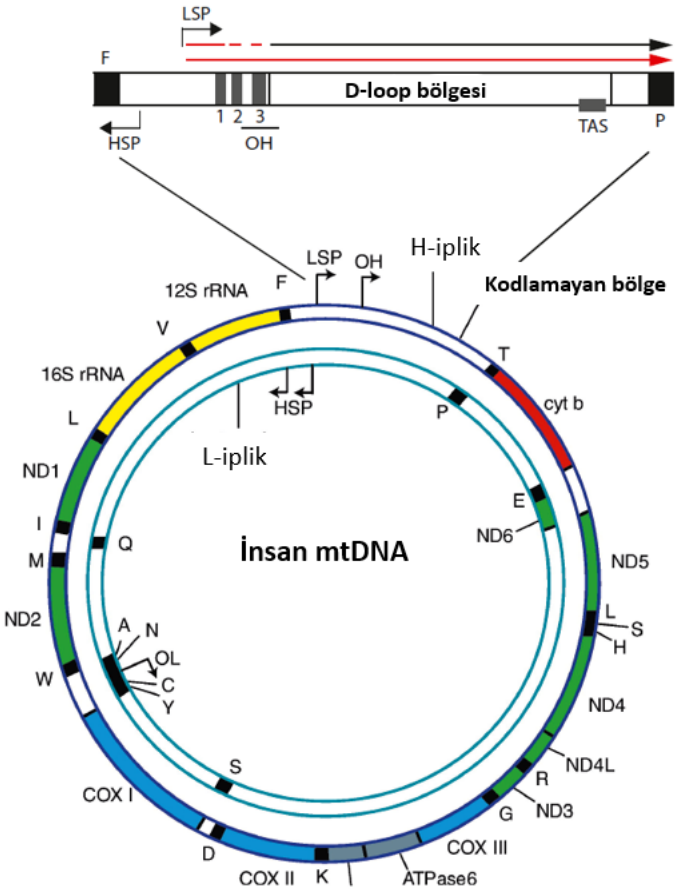
Mitokondriler, kendilerine özgü genomları içerdikleri için canlının hücresel organellerinden farklıdır. Vücuttaki çoğu hücre 10^3 ile 10^4 arasında mtDNA kopyası içerir (Cummins, 1998). Her mitokondrinin 2-15 arasında değişen mtDNA kopyası bulunur. Her kopyasının çift zarlı halkasal 16569 baz çift (bç) uzunluğa sahip olan bu dizi Anderson ve ark., (1981) tarafından tanımlanmıştır. İntronları olmayan genleri vardır ve genler iyi korunmuş bir düzen ile sıkıca paketlenir (Lang, 1999).

Hücrede 13'ü mitokondriyal genler ve 70'i nükleer genler tarafından kodlanan 83 polipeptid OXPHOS vardır. 70 OXPHOS bileşeni, mitokondrinin metabolizması ve onarımı için gerekli bazı proteinler nükleer genler tarafından kodlanır, Mitokondrideki karmaşık moleküler makine, protein translokazları çeşitli şekiller ile içeri alınmaktadır (W., 2005).

mtDNA solunum zinciri enzim kompleksleri 13 temel protein, 22 tRNA ve 2 rRNA'nın toplam 37 gen kodlar. DNA polimeraz ve sonlandırma faktörleri gibi mitokondriyal DNA transkripsiyonu, translasyonu ve replikasyonu için gerekli olan diğer tüm enzimler ve faktörler

nükleer genom tarafından kodlanır, sitoplazmada çevrilir ve daha sonra mitokondriye aktarılır (Schapira, 2006).

İnsan mtDNA'sı, kodlamayan yalnızca bir uzun bölge içerir ve buna kodlamayan bölge veya kontrol bölgesi denir. Bu bölge, H-iplik replikasyonun orijinli düzenleyici elemanları ve hem L- hem de H- iplik (sırasıyla LSP ve HSP) transkripsiyonel destekleyicilerini içerir. Kodlamayan bölgenin uzunluğu ve dizisi, Korunmuş Dizi Bloklarını (Conserved Sequence Blocks) (CSBI-III) ve Sonlandırma İlişkili Diziler (Termination Associated Sequences) (TAS) adlı bir diziyi içeren bazı korunmuş elemanlar dışında farklı hayvanlar arasında değişiklik gösterir (Şekil 2). Çoğu mtDNA molekülü, kodlamayan bölge içinde yer alan D-loop adı verilen üç iplikli bir bölge de içerir. D-loop, bölgeyi O_H'den TAS bölgesi etrafındaki diziye kadar kapsar ve DNA replikasyonunun erken sonlandırılmasının bir sonucu olduğuna inanılır. Erken sonlandırma olayının nedeni hala bilinmemektedir. L-iplik replikasyonunun orijini, O_H'den yaklaşık üçte iki uzakta bulunur (DW, 1981) (Scheffler, 2008).



Şekil 2: Mitokondriyal DNA (mtDNA) ve D-loop bölgesi

2.3. MİTOKONDRİYAL D-LOOP

İnsan mtDNA'sının major non-coding bölgesi (NCR), fenilalanin ve prolinin mt-tRNA genleri arasında yaklaşık 1.1 kb uzanır. NCR, sırasıyla ağır ve hafif zincirlerin transkripsiyonu için HSP ve LSP promotörlerini ve ayrıca ağır zincirli replikasyonun klasik kaynağı olan OH'yi içerir. NCR'nin büyük bir kısmı genellikle yaklaşık 650 nt'lik lineer bir üçüncü DNA zincirini içerir ve stabil bir D-loop yapısı oluşturur. D-loop bölgesi, O_H çevresinden (7S DNA'nın 5' ucunda) tRNAPro genine yakın (7S DNA'nın 3' ucunda) sonlandırma ile ilişkili diziye (TAS) kadar uzanır (Doda, 1981).

Mitokondriyal D-loop ilk olarak elektron mikroskobu altında fare ve tavuk mtDNA moleküllerini incelerken gözlemlendi (Arnberg, 1971) (Kasamatsu, 1971) (Robberson, 1972). D-loop'u greenberg ve arkadaşları ile iki bölgeye ayrıt etmişlerdir. ilk bölge hiper değişken bölge (HVR-1) ve bu bölgeyi 16024-16365 nükleotitler arasında bulunur. İkinci hiper değişken bölge (HVR-2) ve bu bölgeyi 70-340 nükleotitler arasındadır (Greenberg BD, 1983). Üçüncü hiper değişken bölge ise (HVR-3), Lutz ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. 438-574 nükleotit arasında yer alan bir bölgedir (Lutz S, 1997).

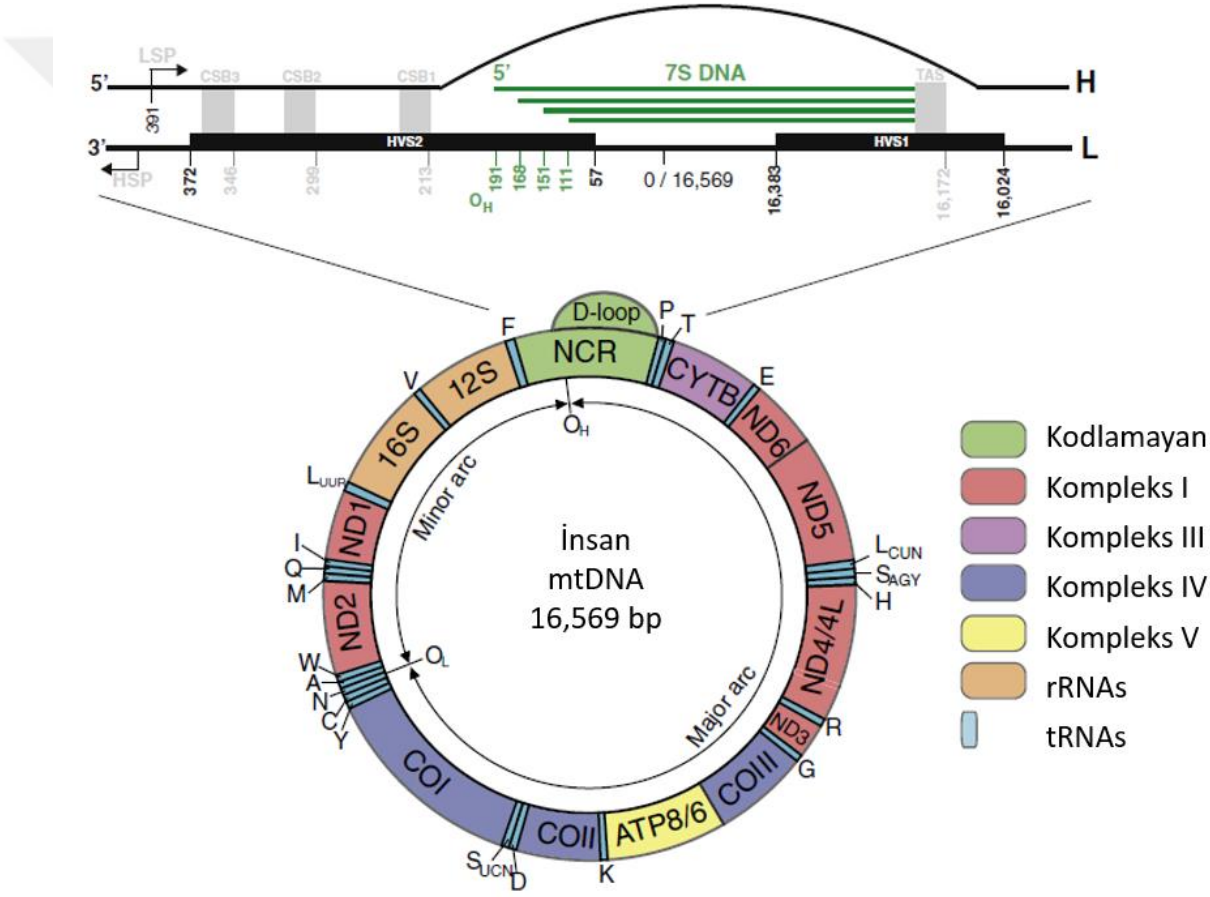
MtDNA D-loop'un İşlevi Nedir?

D-loop'un varlığı kırk yıldan fazla bilinmesine rağmen, bu yapının neden sentezlendiği ve sürdürüldüğü hala anlaşılamamıştır. D-loop'un varlığı için en uzun süredir devam eden hipotez, mtDNA replikasyonunun iplik yer değiştirme modeline göre erken sonlandırılmış ağır iplik replikasyonunun bir ara ürününü temsil etmesidir (Clayton, 1982). Bu hipotez, D-loop'un aynı zamanda major 5'ucunun OH'deki bu sitelerde de gözlendiği gözlemine dayanmaktadır (Shaw, 1996).

D-loop 3' ucunun hemen aşağısındaki bölgeler, hem hastalarda (Zeviani, 1989) hem de hücresel ve hayvan modellerinde genomun başka yerlerinde enzimatik olarak indüklenen çift zincir kırılmalarını takiben silmeler için çok yaygın kesme noktası bölgeleridir. Bu nedenle D-loop'unun sonu, muhtemelen üçüncü ipliğin varlığı bu bölgeyi daha erişilebilir halde olması için kırılmaya ve muhtemelen metilasyona yatkın görünmektedir. 7S DNA sentezi ile ilişkili mtDNA konformasyonundaki bu değişikliğin aslında kendi içinde D-loop'un bir fonksiyonunu oluşturması mümkündür. 7S DNA'nın varlığı, mtDNA molekülünün daha açık bir konformasyonuyla ilişkilidir (Berk, 1974) (Bogenhagen, 1978). Mitokondriyal topoizomeraz Top1mt için tanıma bölgeleri, D-loop sentezi sırasında iplik gevşemesini kolaylaştırabilen D-

loop bölgesinin 5 'veya 3' ucuna yakın haritalanmıştır (Zhang, 2008). Mitokondriyal tek sarmallı DNA bağlayıcı protein (mitochondrial single stand DNA-binding protein) mtSSB veya (Pol γβ) Polgβ 'nin tükenmesi gibi hücrelerin 7S DNA'sını kaybetmesine neden olan koşullar, mtDNA'nın artan aşırı sarmalanması ile ilişkilidir (şekil 3).

D-loop'un olası bir işleviyle ilgili bir başka ilginç hipotez, Holt ve ark., (2007), tarafından önerildi (Holt, 2007). Buna göre D-loop yapısı, mtDNA'nın birden çok kopyasını bir araya getirmeye ve ayırmaya hizmet eder. AAA+ protein ailesine ait bir ATPaz olan ATAD3p, D-ilmeklerine alınır ve mtDNA moleküllerinin etkileşimini ve ayrılmasını ve muhtemelen mtDNA'nın mitokondriyal iç zara bağlanmasını kolaylaştırır (Holt, 2007).



Şekil 3: İnsan mitokondriyal NCR ve D döngüsünün ayrıntılı yapısı.

Nicholls, Thomas J.; Minczuk, Michal (2014). In D-loop: 40years of mitochondrial 7S DNA. Experimental Gerontology, 56(), 175–181.

2.4. MİTOKONDRİYAL DNA REPLİKASYONU

mtDNA replikasyonu, hücre döngüsünden ve nDNA replikasyonundan bağımsızdır ve mtDNA, mitoz sırasında birkaç kez kopyalanabilir veya hiç kopyalanamaz. mtDNA replikasyonunun kesin mekanizması hala bir tartışma konusudur ve bugüne kadar üç farklı model önerilmiştir**: a)** iplik yer değiştirme modeli (Clayton, 1982), **b)** iplikle birleştirilmiş (Holt, 2007), **c)** gecikmeli iplik boyunca ribonükleotit katılımı yoluyla mtDNA replikasyonu (RITOLS) modeli (Yasukawa, 2006) (Pohjoismaki, 2010). D-loop bölgesinde bulunan bazı özellikler, replikasyon çatalı oluşumunu kolaylaştırır. Mitokondriyal DNA'nın replikasyon çatalı, çift sarmal mtDNA molekülünün iki yüzünün açılmasıyla oluşur. mtDNA replikasyon çatalı, özgül proteinlerin D-loop bölgesindeki özgül nükleotid dizilimlerine bağlanmasıyla başlar ve iki çift sarmal zincirin açılmasıyla oluşur. Son çalışmalar, H-iplik mitokondriyal DNA replikasyonunun mitokondriyal RNA polimeraz (POLRMT) tarafından hazırlandığını göstermektedir (Kuhl, 2016).

2.3.1. mtDNA Replikasyonu Modelleri:

2.3.1.1. İplik Yer Değiştirme Modeli (Strand-Displacement Model)

mtDNA'nın nasıl kopyalandığını açıklayan ilk mekanizma, replikasyon ara maddelerinin uzun tek iplikli H-iplik sahip olduğunu gösterildiği elektron mikroskobu görüntülerinden geliştirilmiştir (Kasamatsu, 1973) (Robberson, 1972). MtDNA replikasyonu için önerilen model, iplik yer değiştirme modeli (the strand-displacement model) olarak adlandırıldı. Mekanizma daha sonra, mtDNA replikasyon ara ürünlerinin 5' ucunun keşfetmesiyle ve mtDNA kökenleri bulunduğunda daha ayrıntılı olarak kurulmuştur (Tapper, 1981). Buna göre, O_H'de başlatılan mtDNA replikasyonu, parental H-ipliğini değiştirerek tek yönlü olarak devam eder. O_H'den yaklaşık 2/3 uzakta, başka bir orijinli O_L, yer değiştirmiş H-ipliğinde aktive olur ve yer değiştirmiş zincirin replikasyonu başlatılır (Clayton, 1982). Bu modelde her iki dizi de sürekli fakat eşzamanlı olmayan şekilde gerçekleşir. Son çalışmalar, H-iplik mitokondriyal DNA replikasyonunun mitokondriyal RNA polimeraz (POLRMT) tarafından hazırlandığını göstermektedir (Kuhl, 2016).

2.5. MİTOKONDRİYAL DNA'NIN TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYONU:

2.4.1. Transkripsiyon

Mitokondriyal genomun transkripsiyonu, L-iplik (LSP) ve H- iplik (HSP) promotörlerini içeren kodlama yapmayan başlıca bölgeden kaynaklanır. Hafif iplik promotörü,

sekiz tRNA'nın ve MT-ND6 geninin transkripsiyonunu kontrol eder. Ağır zincirde, tarihsel olarak H-strand iki destekleyici sistem önerilmiştir, HSP1 transkripsiyonu tRNAPhe, tRNAVal ve iki rRNA'yı (12S ve 16S) içeren bir transkript üretirken, HSP2'den transkripsiyon neredeyse tüm genomu kapsayan bir transkript üretir. Bu sonlandırma olayına, mitokondriyal sonlandırma faktörü 1'in (mitochondrial termination factor 1) (MTERF1) spesifik bağlanmasının aracılık ettiği öne sürülmüştür (Terzioglu, 2013).

Bir mitokondriyal RNA polimerazın (POLRMT) primaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir ve bir kalıp olarak ssDNA kullanarak RNA 20-100 nükleotid uzunluğunda sentezleyebilir (Wanrooij, 2008). POLRMT, promotörlerde transkripsiyonel başlatma için ek faktörlere ihtiyaç duyar. Ek faktörler (transkripsiyon faktörü A, mitokondriyal) TFAM ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü 2B, TFB2M'dir (Falkenberg, 2002). TFAM varlığında, POLRMT ile TFAM bağlanma bölgesinin yukarısındaki DNA'yı bağlar, bu da TFAM'ın POLRMT'nin promotörlere alınması için önemli olduğunu gösterir ve TFAM'nin mitokondride transkripsiyonel başlatma için gerekli bir transkripsiyon faktörüdür (Morozov, 2014) (Posse, 2014). TFB2M'nin transkripsiyondaki rolü, POLRMT'ye promotör erimesinde yardımcı olur, çünkü TFB2M'nin gereksinimleri, önceden eritilmiş bir promotör DNA kalıbı kullanıldığında atlatılabilir (Sologub, 2009).

MTERF protein ailesi, farklı türlerde sonlandırma düzeyinde mitokondriyal transkripsiyonun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Deniz kestanesindeki MTERF1 homologu olan mtDBP, transkripsiyonel sonlandırma aktivitesine ek olarak, mtDNA sentezini negatif olarak düzenleyen bir kontra-helikaz görevi gören mtDNA replikasyonunda da rol oynar (Polosa, 2005).

Yeni oluşan RNA ve kalıp olmayan DNA zinciri arasında bir G-quadruplex yapı oluşturulduğunda, L-stand transkripsiyonu sıklıkla CSB1 ve CSB2 dizilerinde mitokondriyal non-coding bölgede sonlandırılır.

2.4.2. Mitokondriyal protein sentezi

Mitokondriyal translasyonu tamamen çeşitli nükleer kodlanmış düzenleyici proteinlere bağlıdır. Memeli mitokondride, mitokondriyal başlatma faktörleri, mtIF2 ve mtIF3, translasyonun başlamasını kontrol eder (Gaur, 2008). Başlatma sırasında, mtIF3, mtSSU'daki peptidil (P) bölgesinde mRNA'nın AUG veya AUA başlatma kodonlarını konumlandırır ve bunların tLSU ve mtSSU'nun erken birleşmesini önler (Bhargava, 2005). Tüm protein sentez

sistemlerinde olduğu gibi, mitokondride translasyon, bir metiyonin kalıntısı ile başlatılır. Bununla birlikte, mitokondri hem başlatma hem de uzama için yalnızca tek bir tRNAMet'in kullanılmasıyla farklılık gösterir. Bunun yerine farklı olarak, aminoas başlatıcı $\mathrm{mt-tRNA^{Met}}$ 'in metiyonin (fMet) formilasyonuna tabi tutulur ve böylece formtIF2 afinitesini arttırması transkripsiyonun sonrası bir modifikasyon yoluyla elde edilir. mtIF2, $\mathrm{fMet-tRNA^{Met}}$'in mRNA ile ilişkisini yönetir ve mitokondriyal monozomun birleştirilmesine ve translasyonun başlatılmasına yönlendirir (Spencer, 2004).

Translasyonun uzamasına mitokondriyal uzama faktörleri, EFTu (TUFM), EFT'ler (TSFM) ve EFGM (GFM1) aracılık eder. Uzamada EFTu, GTP ve aminoasil tRNA ile bir kompleks oluşturur (Ling, 1997).

tRNA'yı alıcı (A) bölgesine yönlendirir ve burada tRNA bazının kodon-antikodon bölgesindeki mRNA ile eşleşir. GTP'nin hidrolizi peptit bağı oluşumunu katalize eder. EFTu serbest bırakılır ve GTP:EFTu kompleksi EFT'ler tarafından yeniden kurulur. EFG1-mt, deasetillenmiş tRNA'nın P bölgesinden salınmasına neden olur, peptidil-tRNA'ları A ve P bölgesinden P ve çıkış (E) bölgesine yer değiştirir, ayrıca mRNA'nın bir kodon boyunca hareket etmesine neden olur (Ling, 1997).

Mitokondriyal translasyonun sonlandırılması, sonunda A bölgesinde bir durdurma kodonunun mevcudiyeti ile tetiklenir. İnsanlarda mtRF1, mtRF1a, C12orf65 ve ICT1 dahil olmak üzere ribozom salım faktörlerine homolojiye sahip dört mitokondriyal protein tanımlanmıştır. Bu faktörler, peptidil-tRNAhidrolaz aktivitesi sağlayan bir tripeptit GGQ motifinin varlığı ile karakterize edilir (Frolova, 1999).

mtRF1'in yapısal analizi, UAA ve UAG durdurma kodonlarını tanıyabilir. mtRF1a, UAA ve UAG durdurma kodonlarında peptidil tRNA'nın hidrolizini katalize (Soleimanpour-Lichaei, 2007). mtRF1a'nın tüm 13mtDNA kodlu polipeptitlerin translasyonunun sonlandırılması için yeterli olduğu öne sürülmüştür. Onlara rağmen MT-CO1 ve MT-ND6 için RNA'lar açık okuma çerçevesinin (ORF) sonunda UAA ve UAG durdurma kodonlarından yoksundur. Bunun yerine, bu ORF'ler, sırasıyla son kodonlar olarak çerçeve içi AGA ve AGG içerir.

Başlangıçta, AGA ve AGG kodonlarında sonlandırma işlevini gerçekleştiren protein olarak ICT1 önerildi. Bununla birlikte, UAA ve UAG için gerekli olan spesifik alanları içeren ne ICT1 ne de C12orf65 salım faktörü homologları kodon tanımayı durdurur (Richter, 2010).

Son kanıtlar ayrıca ICT1'in durmuş mitoribozomlarda peptidil tRNA'ların hidrolizini indükleyebildiğini göstermektedir (Chrzanowska-Lightowlers, 2015). ICT1 peptidil hidrolaz aktivitesini gerçekleştiremediğinden, RNA şablonunun, MT-CO1 ve MT-ND6'da olduğu gibi, A bölgesinin ötesine 14 nükleotide kadar uzanır, ICT1, bu iki mRNA'larin translasyonunun sonlandırılmasına doğrudan dahil olmayabilir (Chrzanowska-Lightowlers, 2015) (Chrzanowska-Lightowlers, 2011).

2.6. ATP ÜRETİMİ VE MİTOKONDRİ

2.6.1. Spermatozoa Hücresinde ATP Üretimi

Spermatozoa hücrelerinin enerjisi glikoliz ve oksidatif fosforilasyon ile olmak üzere iki şekilde gerçekleşir (Tablo 2). glikoliz yolu baskın olan fakat oksidatif fosforilasyon ile daha fazla ATP üretilmektedir. Spermatozoa baş, orta bölüm ve kuyruk olmak üzere üç farklı kompartmandan oluşur. Bu uç bölümde metabolik süreçleri farklı şekilde işlemektedir.

Baş ve kuyruk kısmında glikoliz olayı ile enerji üretimi sağlarken mitokondri sadece orta bölümde bulunur ve bu nedenle enerji üretimi oksidatif fosforilasyonla gerçekleşir.

Tablo 2: Spermatozoada ATP üretim yolu ve işlevleri

ATP Üretim Yolu	Spermatozoa Bölümü	Spermatozodaki Rolü
Glikoliz	Baş, Kuyruk	Kapasitasyon, hiperaktif motilite ve akrozom reaksiyonu
Oksidatif fosforilasyon	Orta bölüm	Spermiyogenez, sperm matürasyonu, aktif motilite

Spermatozoa hücrelerinde bulunan glikoz taşıyıcılar (GLUTs) ile glikoz ve früktoz girişi sağlar ve bunlarla enerjinin büyük kısmı sağlanır.

2.6.1.1. Glikoliz

Olgun spermatozoa hücresinde orta bölümdeki olan mitokondri ile üretilen enerjiyi kuyruğa taşınacak uygun bir sistem olmamasından dolayı buradaki enerji glikoliz ile gerçekleşir. Deneysel çalışmalarda spermatozoa hücresinde oksidatif fosforilasyon durdurulduğunda kuyruk kısmı hareketi devam ettiğini görülmektedir (Narisawa S, 2002). Spermatozoa hareketi ve fertilitesi için özgü bir glikoliz metabolik enzim olan gliseraldehit 3-

fosfat dehidrogenaz-S (GAPDS) gerekli olduğunu gösterilmektedir (Miki K, 2004). Bu nedenle spermatozoa hareketi için glikoliz ile ATP üretmesi temel metabolik yol olarak göstermektedir. Spermatozoa hücrelerin baş bölümü ve kuyrukta kapasitasyon, akrozom reaksiyonlar ve hiperaktif motilitesi için gerekli olan ATP glikoliz vasatisiyle temin edildiğini bilinmektedir (Visconti PE, 1996).

2.6.1.2. Oksidatif Fosforilasyon

Spermatozoanın mitokondri ile enerji üretimi oldukça önemlidir. Spermiyogenez, aktif motilite ve Spermatozoa olgunlaşmasın için oksidatif fosforilasyon ile üretilen enerji kullanılır. Spermiyogenez esnasında spermatozoa hücrelerindeki mitokondrilerde major yapısal değişiklikler oluşur. (De Martino C, 1979). Mitokondrilerde oluşan değişiklikler esnasında hatalar oluşabilir bu nedenle motilite bozuklukları sebep olabilir.

Aksonemin kollarındaki bulunan dynein ATPaz oksidatif fosforilasyon ile elde edilen ATP büyük kısmını kullanır. Spermatozoa hücrelerin maruz kaldığı serbest O_2 radikalleri nedeniyle mitokondride mutasyonların oluşumu sebep olabilir. Bunun sonucu spermatozoa hücrelerinde hareket bozuklukları ortaya çıkabilir (Ünal MS, 2017).

2.7. DNA METİLASYONU VE MİTOKONDRİYAL DNA METİLASYONU

2.7.1. CpG Metilasyonu

Epigenetik, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ekspresyonunu düzenleyen geri dönüşümlü, kalıtsal modifikasyonları ifade eder. Bu modifikasyonlar, histon modifikasyonlarını, DNA metilasyonunu ve non-coding RNA'ları içerir ve bir organizma içindeki farklı hücre tiplerinde farklı gen ekspresyonunu ve biyolojik süreçleri düzenlerler. DNA metilasyonu, üzerinde en çok çalışılan epigenetik modifikasyonlardan biridir. DNA metilasyonu, sitozinin pirimindin halkasının beşinci karbonunda 5mC oluşturmak üzere bir metil grubu ekleyerek veya çıkararak gen ekspresyonunu düzenleyen, iyi çalışılmış bir epigenetik mekanizmadır (Law & Jacobsen, 2010). DNA metilasyonunun hücre gelişimi ve farklaşması üzerinde önemli etkileri vardır (Jaenisch & Bird, 2003) (Smith & Meissner, 2013). Aslında 5mC, bitkiler ve hayvanlar arasında oldukça korunmuş bir epigenetik işarettir. Çoğu 5mC, sitozinlerin %70-80'inin metillendiği CpG bölgelerinde bulunur (Ramsahoye, et al., 2000).

Genin metilasyonu, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Genler arasında yer alan bazı intergenik bölgeler, yakınlardaki genlerin ekspresyonunu da kontrol eder (Jones, 2012). Öte yandan, promotörlerde veya güçlendiricilerde bulunan CpG bölgeleri hipermetillenirse, bu bölgeler heterokromatik hale gelir ve transkripsiyon aktivatörleri tarafından bağlanmaz. Bu, transkripsiyonel susturmasına yol açar (Chodavarapu, et al., 2010) (Shukla, et al., 2011). Bu nedenle, CpG metilasyonu, gen susturması ve ekspresyonu için çok önemlidir.

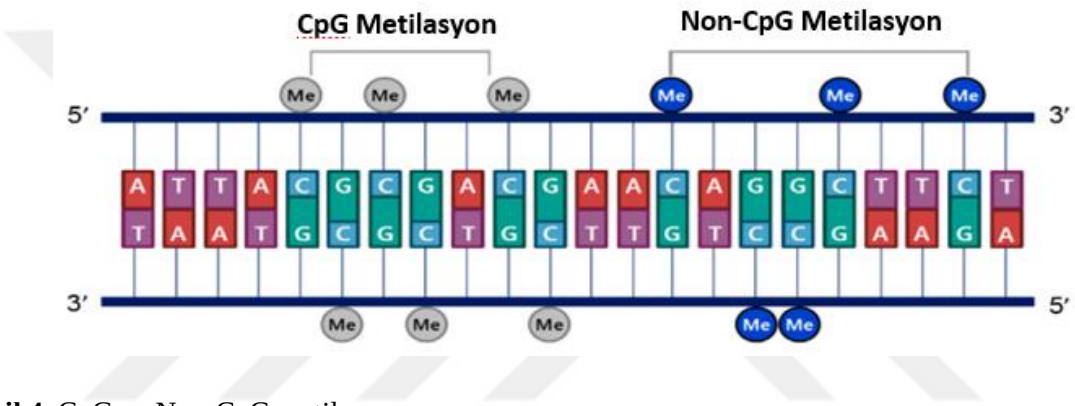
DNA metiltransferazlar (DNMT'ler), metil gruplarının DNA'daki sitozinlere transferinde rol oynayan enzimlerdir. Kısaca, kofaktör S-adenosilmetiyoninden gele n metil grupları, DNMT'ler tarafından sitozinlerin 5. karbonlarına transfer edilir (Christman, 2002). DNMT ailesi üyeleri olan Dnmt1, Dnmt3a ve Dnmt3b, N-terminal düzenleyici alanlara ve C-terminal katalitik alanlara sahiptir. Dnmt1, metilasyon ve kromatin stabilitesinin korunması için esastır (Feng & Fan, 2009) (Chen, et al., 2003) ve Dnmt3a ve Dnmt3b de novo metiltransferazlar olarak işlev görür ve erken embriyonik evrelerde DNA metilasyonu için önemlidir (Okano, et al., 1998) (Okano, et al., 1999).

Öte yandan 5mC, pasif veya aktif DNA demetilasyonu yoluyla demetile edilebilir. Pasif demetilasyon, replikasyondan sonra 5mC'nin seyreltildiği de novo metilasyon olmaksızın DNA sentezi ile gerçekleştirilir. Aktif demetilasyon, sitozin bazının deaminasyon ve/veya oksidasyon yoluyla modifikasyonunu gerektirir (Schofield, 2003). Oksidasyon işlemi yoluyla aktif demetilasyon, (Ten-Eleven-Translokasyon) (TET) proteinleri TET1, TET2 ve TET3 dahil olmak üzere tarafından gerçekleştirilir. TET'ler sitozinin 5-metil grubunu oksitler ve 5mC'yi 5-(-hidroksimetilsitosine (5hmC) dönüştürür.

2.7.2. Non-CpG Metilasyonu

DNA metilasyonu, CpG dizileri dışındaki bölgelerde de bulunur. Bu tip metilasyon, Non-CpG metilasyon olarak adlandırılır ve sitozinlerde metilasyonu takiben adenin, timin veya başka bir sitozin içerir (Şekil 4). CpA, CpT ve CpC gibi CpG olmayan bölgelerde bulunur. DNA metilasyonunun evrensel olarak Non-CpG bölgelerde meydana geldiğini biliyoruz, ancak bu tip metilasyonun işlevi ve mekanizmaları henüz açıklığa kavuşturulmamıştır ve hala tartışmalıdır (Smith & Meissner, 2013) (Patil, 2014). Bazı araştırmacılar, non-CpG metilasyonunun, CpG bölgelerinin spesifik olmayan de novo metilasyonunun hiperaktivitesinin bir yan ürünü olduğuna inanmaktadır (Smith & Meissner, 2013) (Ziller, et al., 2011). Diğerleri,

non-CpG metilasyonun gen ekspresyonu ve doku özgüllüğü ile ilişkili olduğunu söylemektedir (Barres, et al., 2009) Örneğin, tip 2 diyabetli hastalarda, peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör γ koaktivatör 1α (PGC-1 α) geninin promotörü, sağlıklı kontrollere göre non-CpG bölgelerde daha fazla metillenir. Böylece PGC-1 a'nın düşük regülasyonu ile sonuçlanır (Barres, et al., 2009). Beyin hücrelerinde non-CpG metilasyon ve transkripsiyonel baskı arasında bir korelasyon da öne sürülmüştür (Guo, et al., 2014). Diğer raporlar, promotör bölgelerindeki yüksek non-CpG metilasyon seviyelerinin gen baskısı ile ilişkili olmasına rağmen, non-CpG metilasyon seviyelerinin genellikle promotör bölgelerinde düşük olduğunu göstermektedir (Xie, et al., 2012).



Şekil 4. CpG ve Non-CpG metilasyonu**.**

(Jang, et al., 2017) https://doi.org/10.3390/genes8060148

Son çalışmalar, non-CpG metilasyonun Embriyonik kök hücrelerinde, uyarılmış pluripotent kök hücrelerde (iPS hücreleri) (Lister, et al., 2011) somatik hücre nükleer transfer kaynaklı ES (SCNT-ES) hücrelerinde (Ma, et al., 2014). oositler, nöronlar ve glia hücreler zenginleştiğini ortaya koymuştur, ancak çoğu farklılaşmış hücre tipinde nadirdir. İlginç bir şekilde, nöronlar gelişim sırasında non-CpG metilasyonu biriktirir (Guo, et al., 2014) (Varley, et al., 2013). non-CpG metilasyon yetişkin somatik hücrelerde neredeyse yoktur ve somatik hücrelerdeki toplam 5mC'lerin sadece %0.02'sini oluşturur. (Lindroth, 2001), Memelilerde somatik hücrelerde DNA metilasyonu DNMT1, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L (Jurkowska, et al., 2011) tarafından gerçekleştirilir. Non-CpG metilasyon, de novo metiltransferazlar DNMT3a ve DNMT3b tarafından yürütülürken, bakım metiltransferaz DNMT1'i, non-CpG metilasyon modelleri ile ilişkili değildir (Arand, et al., 2012).

2.7.3. mtDNA Metilasyonu

mtDNA metilasyonu, varlığına dair artan kanıtlara rağmen, nDNA'nın metilasyonu kadar kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır (Bender, 2004). nDNA sitozin metilasyonu, ağırlıklı olarak sitozin-guanin dinükleotit (CpG) açısından zengin bölgelerdeki ökaryotlarda bulunur. Metilasyonları, damgalanmış genler gibi genlerin uzun süreli susturulmasından esas olarak sorumludur. Mitokondriyal DNA'nın nDNA'dan farklı olarak küçük genom boyuta sahip ve bu nedeniyle CpG adaları içermez. Metiltransferazların iki sınıfı vardır: metillenmemiş CpG bölgesi üzerinde metilasyon işareti oluşturan de novo metiltransferaz DNMT3a ve DNMT3b ve replikasyon sırasında hemi-metillenmiş bölgelere metil grubunun eklenmesi yoluyla metilasyonu sürdüren bakım metiltransferaz DNMT1 (Lyko, 2018). toplam DNMT1 transkriptlerinin %1-2'sini oluşturan ve mitokondriye translokasyonuna yardımcı olan transkripsiyon başlangıç bölgesinin (TSS) yukarısında hedeflenen bir dizi içeren DNMT1'in (mtDNMT1) mitokondriyal olarak hedeflenmiş bir izoformunu keşfetti. Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama koaktivatörü 1 alfa ve nükleer solunum faktörü 1 gibi hipoksiye duyarlı transkripsiyon faktörlerinin mtDNMT1 ekspresyonunun düzenlenmesinde yer aldığı bildirildi (Shock, 2011). Ayrıca mitokondride diğer DNMT'lerin bulunmasında hücre tipine bağlı olarak tercih göstermekte tutarsız bulunmuştur (Shock, 2011) (Bellizzi, 2013).

Metilsitozin ya replikasyon yoluyla pasif olarak ya da 5-hidroksimetilsitozin (5-hmC) üreten 10-11 translokasyon dioksijenaz (TET) enzimleri tarafından aktif olarak oksidasyon yoluyla demetile edilebilir, bu daha sonra 5-formilsitosin (5-fC) oluşturmak üzere ve daha sonra 5-karboksilsitozin oksitlenebilir (5-caC) (Wu, 2017). Aktif demetilasyon, aktivasyonla indüklenen deaminaz/apolipoprotein B mRNA düzenleme enzimi katalitik polipeptit benzeri 3 (APOBEC3) ile deaminasyon yoluyla da olabilir (Bochtler, 2017).

Kodlamayan D-loop bölgesindeki mtDNA metilasyonu, mtDNA replikasyonu ve transkripsiyonunun düzenlenmesindeki biyolojik önemi nedeniyle diğer bölgelerden daha fazla dikkat çekmiştir, çünkü promotörler HSP ve LSP'yi ve ayrıca OH replikasyonunun kökenini içerir, bu nedenle metilasyonunun olduğuna inanılmaktadır. potansiyel olarak mitokondride bu süreçleri etkilemede rol oynar (Bellizzi, 2013) (Van Waart J, 2001).

CpG metilasyonunun yanı sıra, mtDNA metilasyonunu geniş çapta keşfetme çabalarında olan çalışmalar, mitokondriyal genomda hem CpG olmayan hem de adenin metilasyonunu tanımlamıştır. (Patil, 2019), karaciğer ve göğüs hücre dizilerinde tam genom bisülfit dizilimi kullandı ve mtDNA'nın ağırlıklı olarak CpG olmayan bir bağlamda (CpC, CpT,

CpA) yoğun şekilde metillendiğini (yaklaşık %30) ve CpG bölgelerinin en düşük metilasyon seviyelerine sahip olduğunu gözlemledi.

Fare ve insandaki birkaç raporunda mtDNA metilasyon seviyelerini D-loop veya 12 rRNA veya 16S rRNA'da %2 ila %18 arasında değerlendirmiştir (Wong, 2013) (Byun, 2015). CpG dinükleotidlerinde DNA metilasyonu, hemen hemen tüm memeli hücre tiplerinde ortak olan önemli bir epigenetik düzenleyicidir, ancak son kanıtlar, erken doğum sonrası gelişim sırasında nöronal genomların, aynı zamanda, CpG-metilasyon ve hidroksimetilasyon olmayan iki alternatif metilasyon formunun benzersiz yüksek seviyelerini biriktirdiğini göstermektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Bu çalışmanın etik onayı, 20.01.2021 tarihli E-66018902-050.99-16826 sayılı yazı ile İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Androloji Polikliniği'ne başvuran 25 astenospermik ve 24 kontrol (normospermik) vaka olmak üzere toplam 49 spermatozoa örneği çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya katılan her bir gönüllüye bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatıldıktan sonra alınan Semen örnekleri, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Androloji Laboratuvarı tarafından değerlendirilip Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2010 kılavuzuna göre gruplandırıldı. Örnekler normospermik ve astenospermik olarak iki gruba ayrıldı ve İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı moleküller hücre araştırmaları Laboratuvarı'nda moleküler analizleri yapıldı.

3.1.1. *Çalışmaya Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri*

Çalışmaya en az 2 senedir çocuğu olmayan, 20 ile 48 yaş arası ve astenospermisi olan erişkin bireyler dahil edildi. Ayrıca bu çalışmaya ön bilgilendirmesi yapılan, en az son iki yılda bir çocuk sahibi erişkin 25 sağlıklı birey dahil edildi. Vakalar aktif üreme döneminde olan testis travması veya epididimorşit geçirmemiş hastalar DSÖ laboratuvar kılavuzuna göre astenoospermik kabul edilen kriterlere uygun olarak seçildi. Bilinen malignitesi olan hastalar, kemoterapi veya radyoterapi tedavisi görenler, bulaşıcı hastalığı bulunan kişiler ve herhangi bir kronik hastalığı olan bireyler de çalışmadan dışlanmıştır. Vakalardan 3 günlük cinsel perhiz sonrasında steril kaplara doğal yöntemlerle semen örnekleri alındı ve likefiye olması için yarım saat bekletildi.

3.1.2. Spermatozoa Toplam Motilite ve Progresif Motilite Hesaplaması

Spermatozoa sayımı için uygun hale getirilen semen numuneleri Makler kamarasıyla kontrast mikroskopta 20X-40X büyütmede sayıldı. Sayım işlemi, önceden belirlenmiş karelerdeki hücrelerin hareketlilik durumlarına göre;

(a) hızla ilerleyen hareketli, (b) yavaş hareketli, (c) yerel olarak hareketli ve (d) hareketsiz olarak sınıflandırıldı. Bilinen hacimli sayım alanı kullanılarak, toplam spermatozoa sayısı, motilite ve hareketli spermatozoa sayısı hesaplamaları gerçekleştirildi. Her bir örnekte en az 200 spermatozoa (yaklaşık 8-10 alan) değerlendirildi ve her bir motilite parametresi için ortalama değerler [toplam motilite (derece a + b + c %), progresif motilite (a + b %)] ile spermatozoa konsantrasyonu kaydedildi. Spermatozoa sayım işlemi, en az iki kez tekrar gerçekleştirildi.

3.2. Spermatozoa İzolasyonu

Spermatozoa örneklerinden 1000 µL alındı, 1000 xg'de 10 dakika 4 °C santrifüj edildi. Oluşan pelleti toplanıp üzerine 1000 µL PBS eklenerek 1000 xg'de 5 dakika 4 °C santrifüj ile çevrildi. Süpernatant atıldı ve pelleti toplandı, pelletin üzerine 50 mM 0,05 ml Tris-HCl (pH:6,8, 4-8 ℃) eklendi ve vorteks yapıldıktan sonra +4 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitince örnekler 1000 xg'de 10 dakika 4 °C santrifüj edilip, süpernatantları uzaklaştırıldı. Pellete 1 µl Proteinaz K (20 µg/ml) + 500 µl hücre lizis tampon eklenip 56 ℃'de 15 dk su banyosuna çalkalandı. Sonra 1000 xg ve +4 ℃'de 5 dk santrifüj edildi. Pelleti toplanıp üzerine 750 µl PBS tamponu eklenip 1000 xg ve +4 ℃'de 7 dk çevirerek yıkandı. Yıkama işlemi iki kez tekrarlandı.

Bu işlemden sonra lökosit kök hücrelerinin spermatozoa örneklerinden uzaklaştığını kontrol edebilmek için mikroskop değerlendirmesi yapıldı.

- ***PBS tamponu:*** 0.01 M Na_2HPO_4, 0,0018 M KH_2PO_4, 0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl,
- ***Hücre lizis tamponu:*** 1 M NaCl, 1 M Tris, 1 M EDTA, %0.05 Triton X-100

3.3. ATP Düzeylerinin Belirlenmesi (Biolüminesans)

Elde edilen hasta ve kontrol spermatozoa örneklerine 1 ml PBS çözeltisi eklenerek hücreleri parçalamak için 20 saniye sonikasyon işlemi yapıldı. İşlem her bir vaka için iki tekaralı olacak şekilde yapıldı. Parçalanan hücrelerin ATP seviyelerini ölçmek için ATP Bioluminescence Assay Kit CLC II (Roche) kullanılarak luminometrik olarak üretici firmanın önerdiği yönteme göre belirlendi. Spermatozoa örneklerinden 50 µl lizatı. Her tüpe 50 µl luciferase eklendi ve 10 saniyede bir yaklaşık 1 dakika kemilüminesans ölçümleri alındı. Örneklerin ATP konsantrasyonları ATP standartlarının verdiği kemilüminesans şiddetinden hazırlanan standart eğrilerden hesaplandı. Sonuçlar n mol/mg protein olarak verildi.

3.4. Protein Miktar Tayini (Lowry-Hartree Modifiye Yöntemi)

Lowry yöntemi kullanılarak protein miktarı tayini yapıldı. Bunun için bir protein numunesi hazırlanıldı. Numune hacmi distile su ile 90 µl'ye tamamlandı. Daha sonra proteinler 50 µl 2 M sodyum hidroksit (NaOH) içinde 37 ℃'de yarım saat inkübe edildi. Ardından örnekler üzerinde 1 ml I. çözelti eklendi ve 10 dakika 20 ℃'de tekrar bekletildi. Daha sonra örneklerin üzerinde 100 ml II. çözelti eklendi, 37 ℃'de yarım saat bekletilen örneklerin A_{750} absorbsiyon değerleri okundu. Numunedeki protein konsantrasyonu, standart bir eğri kullanılarak hesaplandı. Bilinen bir dizi protein konsantrasyonunun absorbansı ölçülerek standart bir eğri hazırlandı. Numunedeki protein konsantrasyonu, numunenin absorbansının standart eğriyle karşılaştırılmasıyla belirlendi.

- ***I. Çözelti:*** 1 ml $CuSO_4$ 5 H_2O + 50 ml %2 NA_2CO_3 + 1 ml %2 Potasyum Sodyum Tartarat
- ***II. Çözelti:*** Ciocalteau'nun fenol reagenti - Folin + H_2O (1:1)

3.5. DNA Izolasyonu

Spermatozoa örneklerinden ticari kit kullanarak (ZymoResearch Quick-DNA Kits) DNA izolasyonu yapıldı. DNA saflık ölçümleri ve konsantrasyonu, 1'er µl DNA örneği alınarak NanoDrop Scientific TM 1000 cihazıyla belirlendi. Saflık ölçümü yaptıktan sonra örnekler -80 ℃'de saklandı.

3.6. DNA Bisülfit Modifikasyonu

Çalışmaya katılan bireylerden elde ettiğimiz DNA örneklerinin bisülfit modifikasyonu üretici firmanın (Zymo EZ DNA Methylation-Gold™ Kit) tavsiye ettiği yönteme uygun olarak yapıldı. DNA konsantrasyonu ve saflık ölçümünden sonra örnekler -80 ℃'de muhafaza edildi.

3.7. Mitokondriyal DNA D-loop CpG Metilasyon açısından değerlendirilmesi

3.7.1. MtDNA D-loop CpG Metilasyon Oranı Tespiti İçin Referans DNA'nın Oluşturulması

Metillenmiş referans için, spermatozoa örneklerinden izole edilen mtDNA, mitokondri restriksiyon enzimi BamHI (Fast Digest BamHI Thermofisher Scientific) tarafından kesildi. Daha sonra DNA örneklerini metillemek için M.SssI CpG Metilaz (New England BioLabs Inc.,

Beverly, MA, ABD) enzimi kullanıldı. Ardından aşağıdaki maddeleri kullanarak 50 µl reaksiyon hacmi ile 16 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi:

- 10 U M.SssI CpG Metilaz
- 160 µM S-adenosilmetiyonin
- NE Tampon 2 µl (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM ditiotreitol, 10 mM $MgCl_2$, pH 7,9)

Bu işlem bittikten sonra tüm DNA'nın metillenmiş olması gerekmektedir. Metilenmemis referans için sağlıklı kontrollerden elde edilmiş ve ilgili bölge için metillenmediği Sanger dizileme metodu teyit edilmiş DNA örneği kullanıldı. Ardından elde ettiğimiz her iki standart (metillenmiş ve metilenmemiş) örneklerine bisülfit modifikasyon yöntemi uygulandı.

3.7.2. MtDNA D-loop CpG Standart Oluşturulması ve Metilasyon Oranı Tespiti

Çalışmamızda D-loop metilasyon oranı tespiti için adı geçen referans mtDNA'lardan PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) yapıldı. PZR yönteminde kullanılan primerler şunlardır:

- 5'-TAGGGTTATAAAGTTTAAATAGTTTATA-3'
- 5'-ACAAAAATCAAAAACAAATACTAC-3'

Primerler CpG adacığı içermemekle birlikte elde edilen 200 bç üründe 10 adet CpG adacığı bulunmaktadır. PZR işlemi ardından agaroz jelden gene özgü PZR ürününün izolasyonu yapıldı.

PZR işlemleri ardından agaroz jelden gene özgü PZR ürünlerin izolasyonu "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche) ticari kit protokolune göre yapıldı. Elde ettiğimiz referans hem metile hem unmetile bölgeyi temsil eden 200 bç'lik ürünler, pEGM-T Easy klonlama kiti (Promega) prospektusune uygun olarak vektöre aktarıldı. Ardından hem metile hem unmetile temsil eden 200 bç'lik (MtDNA-D-loop) Vektör ayrı ayrı bakteriye transforme edildi ve çoğaltıldı. Daha sonra Qiagen QIAprep Miniprep Kiti Protokolüne göre Plazmid DNA'sı elde edildi. pEGM vektörüne klonlanmış olan metile ve unmetile 200 bç'lik ürün kullanılarak standart eğrileri hazırlandı.

D-loop bölgesinin metilasyonu, Methylation Sensitive Melt Curve Analysis (Metilasyona Duyarlı Erime Eğrisi Analizi, MD-EEA) tekniği vasıtasıyla değerlendirildi.

Çalışmamızda MD-EEA yönteminde kullanmak üzere CpG içermeyen aşağıdaki primerler tasarlandı:

- 5'-TAGGGTTATAAAGTTTAAATAGTTTATA-3'
- 5'-ACAAAAATCAAAAACAAATACTAC-3'

Gerçek zamanlı PZR tekniği kullanılmak suretiyle bir örnekteki bilinmeyen mtDNA D-loop metilasyon oranının bulunması için en uygun yol eksternal standart eğrileri kullanmaktır (Smith E, 2009). Bu nedenle çalışmamızda daha önce bahsettiğimiz hem metillenmiş hem de metillenmemiş bölgelerle ilişkili temsili referans DNA'ları içeren plazmidlerden %100, %75, %50, %25, %10 ve %0 oranında standartlar oluşturuldu. Bu standartlardan hazırlanan erime eğrileri (Tm, (Melting Curve)) kullanılarak metilasyon %'leri hesaplandı.

- PZR protokolü (içeriği ve uygulanan işlemler) aşağıda verilmiştir:
  - Mix: 5µl
  - H_2O: 2,8µl
  - Primer (f): 0,6µl
  - Primer (r): 0,6µl
  - DNA: 2µl

Tablo 3

	Sıcaklık	***Zaman***
Ön Denatürasyon	+95 °C	10 dk
Denatürasyon	+95 °C	15 sn
Primer Bağlanması	+48 °C	30 sn
Zincir Uzaması	+60 °C	30 sn

40 döngü

Erime Eğrisi (Melt Curve) analizleri için termal profil 95 ℃-15 sn, 60 ℃-1 dk ve 0,2 artış ile 90 ℃-15sn olacak şekilde programlanmıştır.

3. 8. Mitokondriyal DNA D-loop Non-CpG Metilasyon açısından değerlendirilmesi

3.8.1. Primer Dizaynı

MtDNA D-loop Non-CpG metilasyon durumunu belirlemek için kullanılan primer dizileri ilgili bölgedeki Non-CpG adalarına özgül metile ve unmetile bölgeleri çoğaltmaya yönelik olarak, Methprimer (https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi) ile dizayn edildi. Bu doğrultuda çalışmada kullanılan MtDNA D-loop Non-CpG unmetile ve metile bölgelere özgü primer dizileri, Tablo 4' de verildi.

Tablo 4: Primer dizisi ve elde edilecek ürün miktarı

Gen adı	Primer dizileri	Elde edilen ürün miktarı (baz çifti)
MtDNA-loop Non CpG Unmetile	5'- TATTTATTTTTAATAGTATA-3' 5'- ATAGTTTATTTTAGTTATTT -3	164 bç
MtDNA-loop Non CpG Metile	5'- TACCCACCCTTAACAGTACA -3' 5'- ACAGTTCACTTTAGCTACCC -3'	164 bç

3.8.2. Gerçek zamanlı PZR ile mtDNA-loop Non-CpG Metilasyon Oranının Belirlenmesi

MtDNA D-loop Non-CpG metilasyon miktarı Eş Zamanlı PZR yöntemle belirlendi. Bunun için uygun olan eksternal standart eğrileri hazırlandı: metile ve unmetile temsil eden standart referans DNA'ları kullanarak, mtDNA D-loop non-CpG metile (164bc) ve Unmetile (164bc) bölgelerinin her biri ayrı ayrı daha önce belirtiğimiz protokolü tekrarlayarak plazmidler hazırlandı. Bakterilerde çoğaltılan ve ekstre edilen plazmidlerden hem metile hem de unmetile ayrı ayrı temsil eden standartlar için seri dilüsyonlarla 5 ayrı konsantrasyon hazırlandı. Dilüsyonlara ait Ct verileri ile hazırlanan standart eğrilerden konsantrasyon hesaplanması gerçekleştirildi.

Örneklerin metile ve unmetile profil analizi için ABI stepone plus cihazında eş zamanlı PZR yöntemi ile aşağıda belirtilen reaksiyon karışımı kullanılarak analizler gerçekleştirildi.

Es zamanlı PZR koşulları (FAST EVA GREEN qPCR MASTER MIX ABMgood)

PZR reaksiyonu örneği aşağıda gösterilmiştir:

Mix 5µl

H_2O 2,8µl

Primer (F) 0,6µl

Primer (R) 0,6µl

DNA (10ng) 2µl

Tablo 5

	Sıcaklık	***Zaman***
Ön Denatürasyon	+95 °C	10 dk
Denatürasyon	+95 °C	15 sn
Primer Bağlanması	+52 °C	30 sn
Zincir Uzaması	+60 °C	30 sn

40 döngü

Çalışmada elde ettiğimiz konsantrasyonlardan kopya sayısı belirleyebilmek için ilgili web bağlantısını kullandı: https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html. Metilasyon miktarı % = (MtDNA-loop Non-CpG Metile kopya sayısı / Non-CpG Unmetile kopya sayısı + MtDNA-loop Non-CpG Metile kopya sayısı x100) formülünden hesaplandı.

3.9. Mitokondri DNA Kopya Sayısının Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi

Gerçek zamanlı PZR için uygun koşullar belirlendikten sonra, tüm gruplarda spermatozoadan elde edilen DNA'larda bisülfit modifikasyon sonrası gerçek zamanlı PZR yapıldı. Gerçek zamanlı PZR tekniği kullanılmak suretiyle bir örnekteki bilinmeyen total mtDNA miktarının bulunması için en uygun yol eksternal standart eğrileri kullanmaktır. Bu nedenle çalışmamızda hem total mtDNA hem de bir genomik kontrol gen olan (housekeeping) β-actin geni içeren önceden hazırlanmış plazmidlerden, 10'ar kat azalan 5 seri dilüsyonla 5 standart konsantrasyon oluşturuldu. Elde ettiğimiz verilerden kopya sayısı belirlemek için https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html adresi kullanılarak total mtDNA/β-actin kopya sayısı oranı hesaplandı.

3.10. İstatiksel Analiz

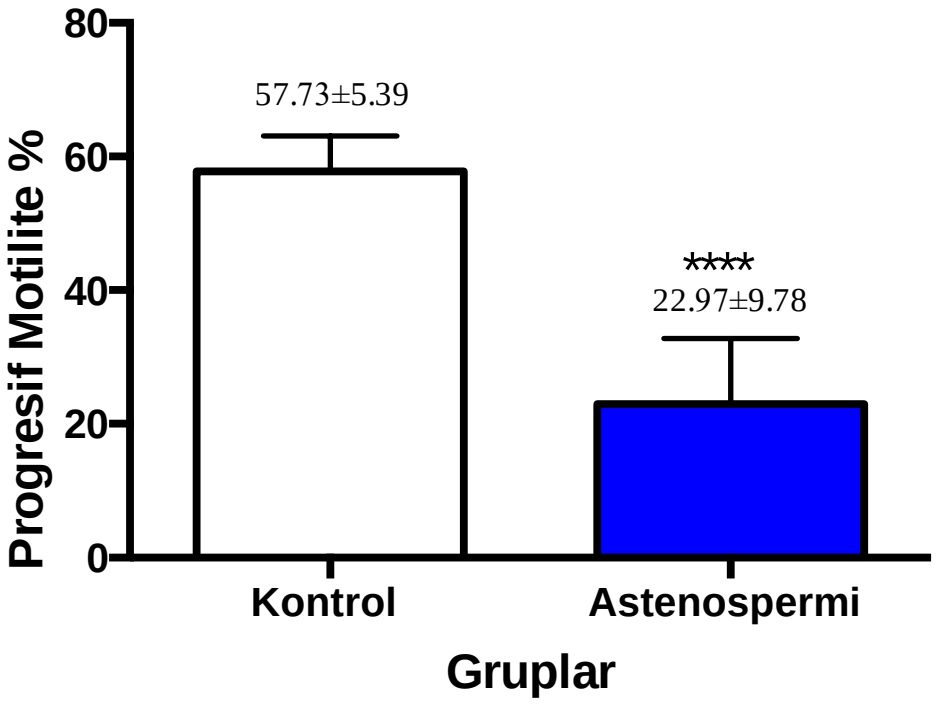
Deney sonuçlarının istatistiksel analizleri için GraphPad Prism 5 programı kullanıldı. Çalışmadan elde edilen verilerin gruplara göre normal dağılım testi Kolmogorov-smirnov testleri ile yapılmıştır. Elde edilen verileri gruplara göre karşılaştırmasında normal şartı sağlamadığı için değişkenler Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Kolerasyon analizi için Spearman rho testi kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmada 25 olgu (astenospermik) ve 24 kontrol (normospermik) vakadan olmak üzere toplam 49 örnek dahil edilebildi. Çalışmada kullanılan örneklerin kontrol ve hasta örneklerin yaşları t testi ile değerlendirildiğinde kontrol (normospermik) örnekleri için ortalama ± SD; 33,16 ± 5,76 (22-48), olgular için (Astenospermik) ise 32,50 ± 6,02 (20-46) olarak hesaplandı ($p>0,05$).

4.1. Progresif Motilite %

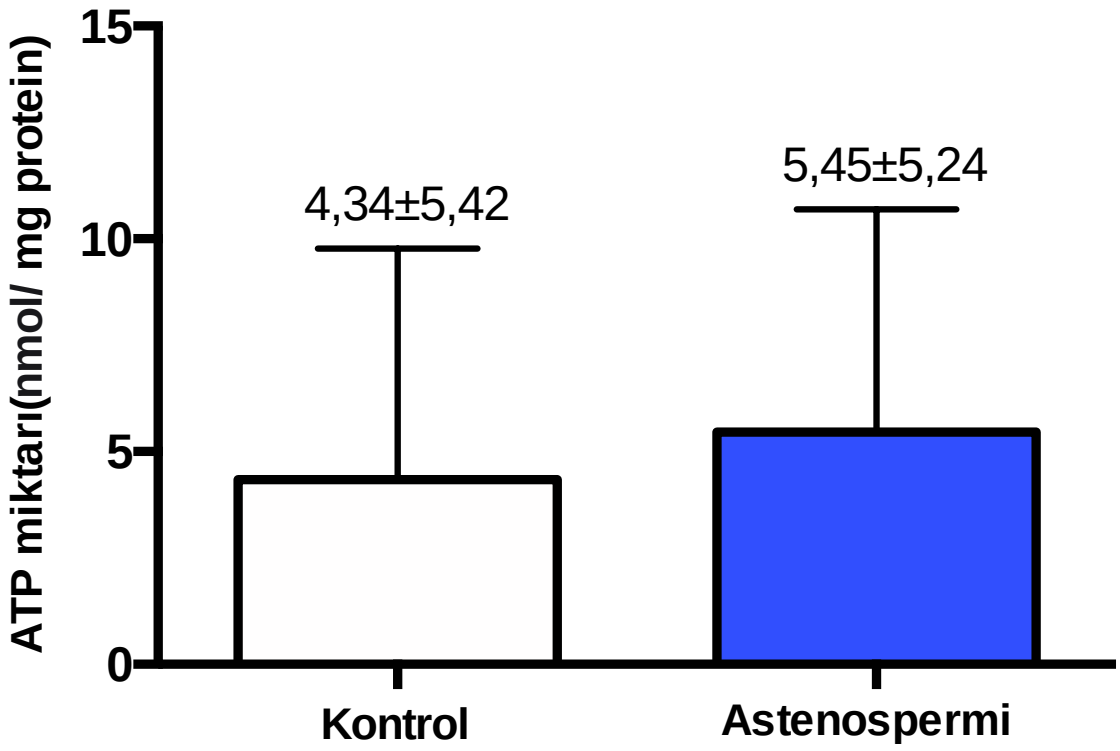
Progresif motilite yüzdesi yöntem kısmında belirtildiği gibi hesaplandı ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Buna göre astenospermi grubunun progresif motilitisi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p<0,0001$)(Şekil 6).



Şekil 5. Astenospermi (n=25) ve kontrol (n=24) gruplarına ait Progresif Motilite yüzdesi. Grafiklerin üzerindeki rakamlar ilgili grubun ortalama ±SD değerleridir.
**** Astenospermi grubunun progresif motilitesi, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşüktü ($p<0,0001$).

4.2. Spermatozoa Hücre İçi ATP Düzeyleri

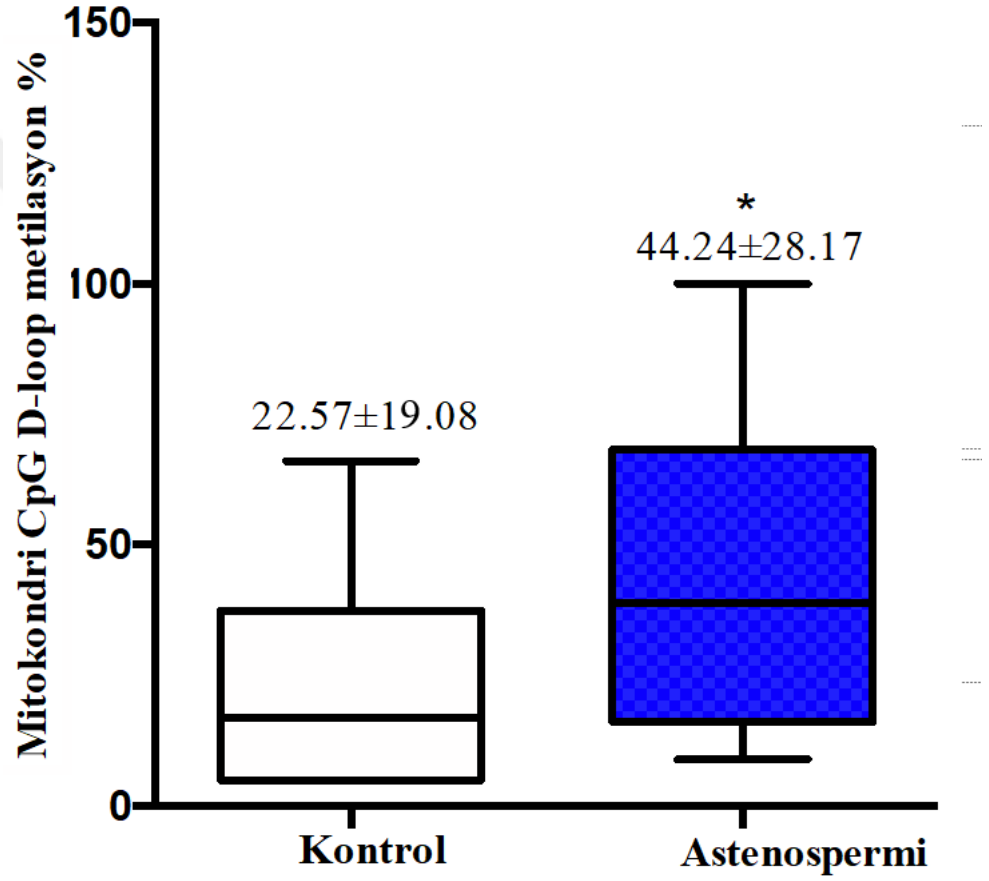
Lüminometrik kit kullanılarak elde edilen ATP seviyeleri, Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, infertil spermatozoa örnekler ve kontrol grupları arasında önemli bir fark görülmedi (p=0,159). Grupların verilerinin değişim katsayısı (CV) değerleri ise; astenospermi grubu için %96, kontrol grubu için %124 olarak hesaplandı (Şekil 7).



Şekil 6: Astenospermi (n=25) ve kontrol (n=24) gruplarında ait spermatozoa mitokondri ATP seviyeleri. Veriler ortalama ±SD olarak gösterilmiştir.

4.3. mtDNA D-loop CpG Metilasyon % Miktarlarının Eş Zamanlı PZR Analizi

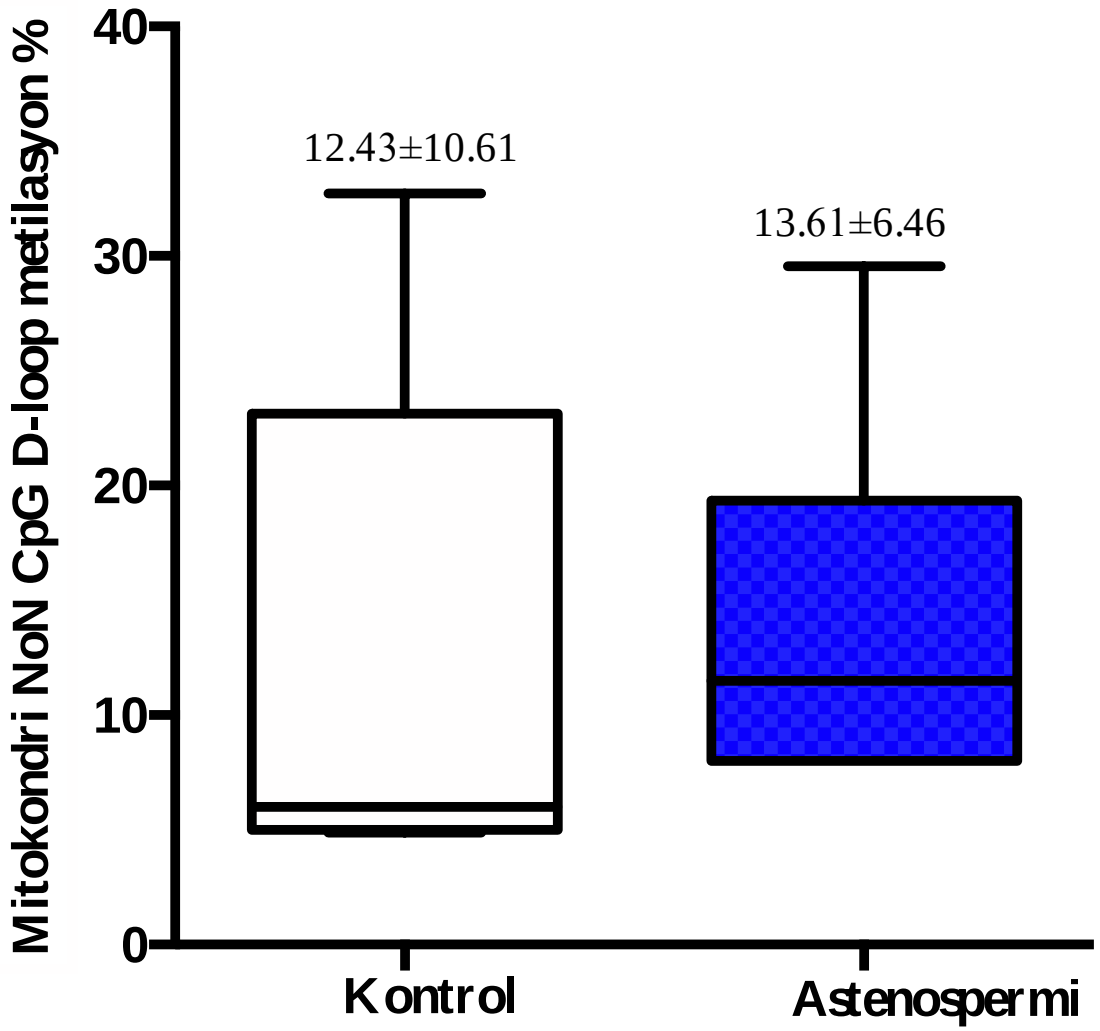
Metilasyona Duyarlı Erime Eğrisi Analizi yöntemi ile elde edilen metilasyon seviyeleri Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, hasta grubunun metilasyon oranları kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (p=0,012). Bu durumda astenospermi spermatozoa mtDNA'sının D-loop metilasyonu, kontrol grubundakilere göre 1,9 kat daha yüksek hesaplanmıştır. Grupların verilerinin değişim katsayısı (CV) değerleri ise; astenospermi grubu için %64, kontrol grubu için %85 olarak hesaplandı (Şekil 8).



Şekil 7: Astenospermi (n=25) ve kontrol (n=24) mitokondri D-loop metilasyon oranı. Grafik üzerindeki veriler grubun ortalama ±SD değerleridir.
*hasta grubunun metilasyon oranları kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (p<0,05).

4.4. mtDNA D-loop Non-CpG metilasyon% Miktarlarının Eş Zamanlı PZR Analizi

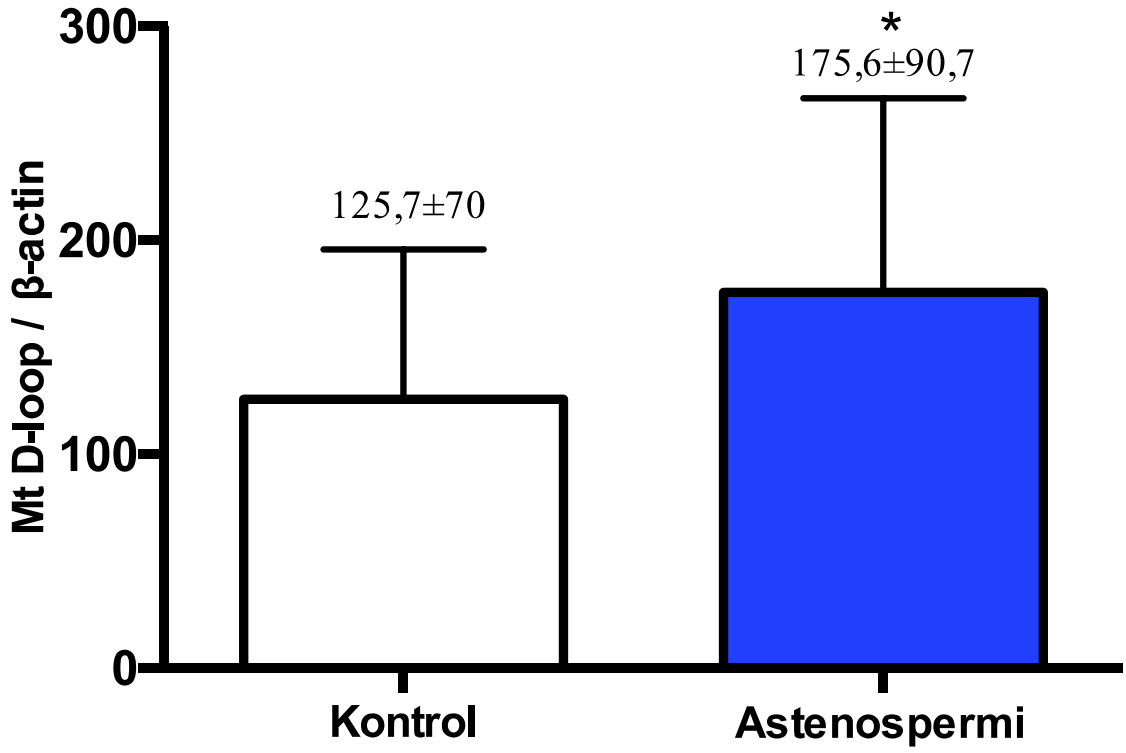
Spermatozoa örneklerin Non-CpG metilasyon miktarı Eş Zamanlı PZR yöntemle ile belirlendi ve Mann Whitney U testi ile de değerlendi. Sonuçlarımız iki grup arasında istatistiksel fark olmadığını gösterdi (p>0,05). Grupların verilerinin değişim katsayısı (CV) değerleri ise; astenospermi grubu için %47, kontrol grubu için %131 olarak hesaplandı (Şekil 9).



Şekil 8 . Astenospermi (n=25) ve kontrol (n=24) guruplarına ait mitokondri D-loop bölgesinin non-CpG metilasyon seviyeleri. Grafik üzerindeki veriler grubun ortalama ±SD değerleridir. Mann Whitney testine göre anlamlılık seviyesi p>0,05.

4.5. mtDNA Kopya Sayısının Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi

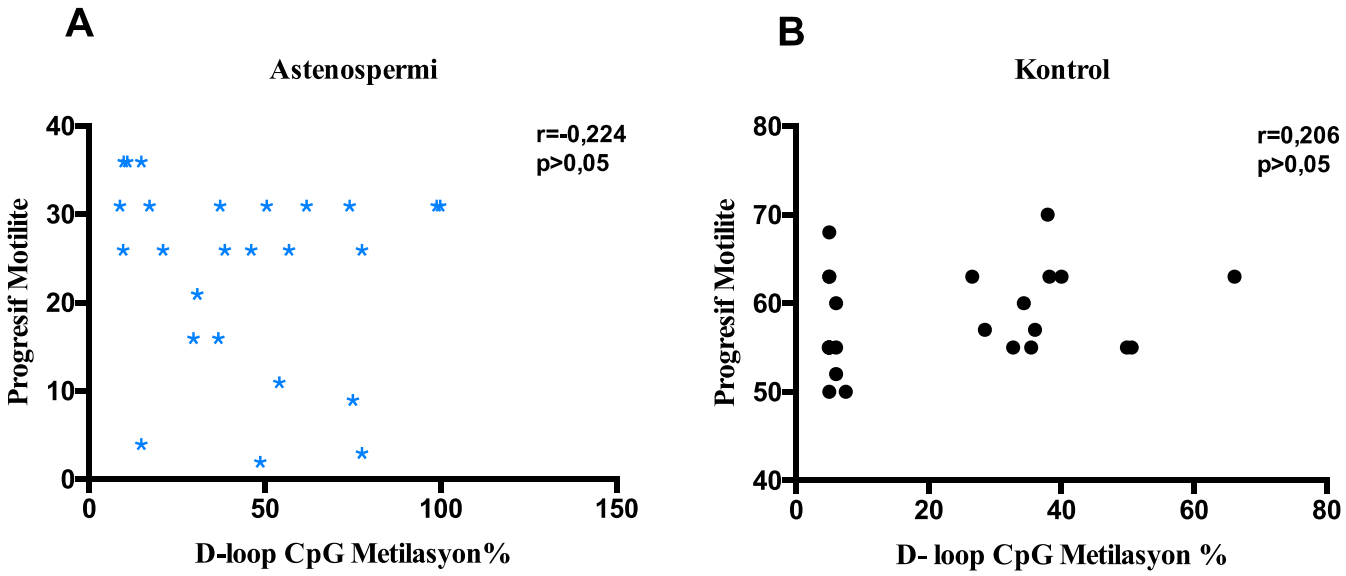
Astenospermi örneklerinden elde edilen mtDNA kopya sayısı (mtDNA/β-actin) kontrol örneklerine göre daha yüksek miktarda bulunmuştur (p=0.024) (şekil 10). Grup verilerinin değişim katsayısı (CV) değerleri ise; astenospermi %52 ve kontrol grubu %56 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 9: Astenospermi (n=25) ve kontrol (n=24) spermatozoasındaki mtDNA kopya sayısı Grafiklerdeki grubun ortalama ±SD değerleridir.
* mtDNA kopya sayısı (mtDNA/β-actin) kontrol örneklerine göre daha yüksek miktarda bulunmuştur (p<0,05).

4.6. Progresif Motilite Yüzdesi ile mtDNA D-loop CpG Metilasyon Yüzdesi Arasındaki Korelasyon Analizi

Progresif Motilite yüzdesi ile mtDNA D-loop CpG Metilasyon Yüzdesi arasındaki ilişkiler Spearman rho korelasyon analiziyle değerlendirildi. Her bir çalışma grubunun değerleri ayrı ayrı analiz edildiğinde, iki parametre arasında bir istatiksel korelasyon gözlemlenmemiştir (Şekil 11).



Şekil 10. Astenozoospermi ve kontrol guruplarina ait progresif motilite yüzdesi ile mtDNA D-loop CpG Metilasyon Yüzdesi arasındaki korelasyonlarının analizi. Her grubun p ve r değerleri şekil içinde belirtilmiştir.

5. TARTIŞMA

Spermdeki hareket bozuklukları, erkek infertilitesinin en önemli sebeplerinden biridir. Astenospermiye neden olan birçok mekanizma vardır. Fakat motilite bozukluklarının sebeplerinden biri de sperm hareketi için gerekli olan ATP'nin üretiminde ortaya çıkan sorunlardır (Vertika S, 2020).

Spermatozoa hücreleri ATP ihtiyaçlarını diğer çoğu hücreler gibi substrat düzeyinde ve oksidatif fosforilasyondan karşılamaktadır. Spermatozoa hareketi için kullanılacak olan ATP'nin diğer çeşitli fonksiyonlarda olduğu gibi oksidatif fosforilasyondan da karşılandığına dair kanıtlar bulunmaktadır (Castellini C, 2021) (du Plessis SS, 2015). Mitokondride oksidatif fosforilasyon ile ATP üretilerek ihtiyaç duyulan proteinler sentezlenir. Sentezlenen protein mitokondri genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerden dolayı ATP seviyesinde de çeşitli etkiler gösterebilmektedir (Reinecke F, 2009). Mitokondri genomun içinde gerçekleşen mutasyonların astenospermi ile bağlantılı olduğunu ortaya koyan bazı çalışmalar bulunmaktadır. Fakat aradaki etkileşim ne kadar kuvvetli olsa da hiçbiri astenospermi patogenezini tam anlamıyla açıklayamamaktadır (Abd Elrahman MM, 2021).
Mitokondriyal genler tarafından üretilen 37 gen vardır ve bunlardan 13'ü oksidatif fosforilasyonla ilgilidir. D-loop adı verilen bir bölgede bu proteinleri kontrol eder. Son araştırmalar, D-loop içindeki CpG adacıklarındaki DNA metilasyonunun mitokondriyal gen ekspresyonunda ve mtDNA'nın replikasyonunda rol oynadığını göstermiştir. (Iacobazzi V, 2013) Promotör görevi gören D-loop bölgesi mitokondrideki genlerin ekspresyon düzeylerini kontrol eder. D-loop 'da bulunan bazı bölgelerin metilasyon değişiklikleri, kolorektal kanser, Alzheimer, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarla ilgili metilasyon değişiklikleri ile ilişkilidir (Stoccoro A, 2017) (Stoccoro A, 2018).

DNA metilasyonu, CpG dizileri dışındaki bölgelerde de bulunur. Bu tip metilasyon, Non-CpG metilasyon olarak adlandırılan sitozinlerde metilasyonu takiben adenin, timin veya başka bir sitozin içerir. CpA, CpT ve CpC şeklinde ifade edilen bu metilasyon tipi CpG olmayan bölgelerde bulunur. Bazı araştırmacılar Non-CpG metilasyonun gen ekspresyonu ve doku özgüllüğü ile ilişkili olduğunu söylemektedir (Patil, 2014) (Barres, et al., 2009) (Guo, et al., 2014) . Örneğin, tip 2 diyabetli hastalarda, peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör γ

koaktivatör 1α (PGC-1 α) geninin promotörü, sağlıklı kontrollere göre non-CpG bölgelerde daha fazla metillenir. Bu nedenle PGC-1 a'nın düşük regülasyonu ile sonuçlanır (Barres, et al., 2009). Beyin hücrelerinde non-CpG metilasyon ve transkripsiyonel baskı arasında bir korelasyon da öne sürülmüştür (Guo, et al., 2014). Böylece literatürde metilasyon ile ilgili çalışmalarda çeşitli patolojilerle ilişkili olabileceği mevcuttur. DNA metilasyonunun çeşitli nörolojik hastalıkları oluşumun mekanizması anlamamıza yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle, spesifik DNA metilasyon değişiklikleri anlamasında, hastalığın erken tanı ve epigenetik ilaçları sağlamakta yardımcı olabilir (Urdinguio, et al., 2009).

Literatür bilgilerimiz nüklear genoma ait bazı genlerin bazı CpG bölgelerinin anormal DNA metilasyonu ile astenospermi ve ciddi spermatozoa DNA bozukluğu dahil olmak üzere zayıf spermatozoa kalitesi ile ilişkilendirildiği görülmektedir (Bing Song, 2022) - (Song B, 2021). Aralarında oligoastenozoospermi ve astenozoospermi vakalarından alınmış örneklerle yapılan çalışmalarda da nDNA'sında anormal metilasyon ile ilişkilendirilmiştir (Sujit, 2018) - (Zhang, 2019). Normozoospermi ve astenospermi örneklerin mitokondriyal genlerinin dizi analizleri, astenospermi vakalarda *MT-ND1*, *MT-ND2*, ve *MT-ATPaz* genlerinin farklı nükleotit pozisyonlarında birçok mutasyonun varlığını ortaya çıkardı (Abd Elrahman MM, 2021).

Her ne kadar nDNA 'nın epigenetiği ile infertilite arasındaki ilişkiyi inceleyen çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte, mtDNA epigenetiği ile ilgili çalışmalar son yıllarda toplanmaya başlamıştır (Nidhi Sharma, 2019) (Ercili., 2021).

Bugüne kadar, mtDNA'da metilasyonu tanımlamayı amaçlayan çalışmaların çoğu, CpG adacıklarında metilasyon belirlemeye odaklanmıştır. Ancak bu çalışmalar mtDNA Non-CpG metilasyonunda uğrayacağına göstermek ile birlikte spermatozoa kalitesi ve infertilite ile ilişkisini ilgilenen çalışmalar değildir. (Bellizzi D, 2013) (Bianchessi V, 2016) (Koh CWQ, 2018).

Literatür bilgilerimiz mtDNA ekspresyonun kontrolünün mtDNA transkribe olacak genlerin ekspresyonu ve dolaysıyla mitokondriyal fonksiyonu ile ilişkili olabileceğini gösterebilir. (Ercili., 2021) Dolaysıyla polisestronik olarak transkribe olan mtDNA'nın genlerini transkripsiyon kontrol eden D-loop bölgesinin metilasyon durumu değerlendirilmesi erkek infertilitesinde mekanizmayı açıklamaya bir katkıda bulunabilir.

mtDNA ve D-loop bölgesindeki metilasyonu ile infertilite anahtar kelimeler ile Pubmed ve Web of Science veri tabanları üzerinde yaptığımız literatür taraması, mitokondriyal DNA'sının D-loop metilasyonu ile erkek infertilite arasındaki ilişkiyi doğrudan açıklayan bir makale olmadığını göstermektedir.

Bu gözlemlerimiz doğrultusunda bu tez projesindeki amacımız, mtDNA D-loop bölgesinde metilasyonu ve spermatozoa hareketi ile arasındaki ilişki ortaya koymaktadır. Elde edeceğimiz verilerin infertilite ve astenospermi patogenezinde mtDNA'nın epigenetiğin rolünü ortaya koyacak bazı ip uçları verebileceğimi düşünmekteyiz.

Çalışmamızın sonuçları astenospermik vakaların spermatozoa mtDNA CpG metilasyon miktarları normospermik vakalara göre her ne kadar 1,9 kat daha yüksek olmakla birlikte, non-CpG metilasyonu yönünden iki grubun bir farklılığı olmadığını ortaya koymaktadır. Benzer CpG adacıklarının değerlendirildiği bir uzmanlık tezi çalışmasındaki sonuçlar bizim CpG adacıklarından elde ettiğimiz sonuçlarla paralellik içinde olduğu görülmektedir (Ercili., 2021). Ancak literatürde her iki metilasyon tipini değerlendiren bir infertilite çalışması bulunmamakla birlikte, gözlemlenen profil farklılığına benzer bir durum için bazı klinik patolojiler bildirilmiştir. Bir çalışmada Parkinson hastalarının substantia nigra mitokondriyal D-loop DNA'sının CpG bölgelerinde kontrol bireylere göre metilasyon seviyelerinde düşüklük görülmekle birlikte non-CpG bölgelerinde bir farklılık görülmemiştir (Marta Blanch, 2016) (White, 2002). Ancak elimizdeki verilerden böyle bir durumun etkisinin ne olduğunu söylemek mümkün değildir.

Bulgularımızdaki ikinci önemli verisi ise astenospermik vakalardaki progresif motilite yüzdesi ile mtDNA D-loop CpG metilasyon yüzdesi arasındaki korelasyonlarının analizi sonucu iki parametre arasında bir istatiksel korelasyon gözlemlenmemiştir. Böylece spermatozoa fonksiyonlarındaki değişiklikler, mtDNA metilasyon düzeylerindeki değişikliklerle ilişkili olmadığını göstermektedir. Bilindiği üzere, spermatozoa ATP üretimini glikolitik yoldan da gerçekleştirebilmektedir. Bu nedenle, hücre içi ATP seviyesi glikolitik yoldan gelen bir kompansasyon mekanizmasıyla belirli bir seviyede tutulabilir.

Var olan sonuçlar her iki grupta da bireyler arası açık bir varyasyon olduğunu göstermektedir. Ancak bu varyasyonun nedeni önceki literatürdeki gözlemlerden değişim kat sayısı değerleri yüksek olması metilasyon yüzdesi ile ilgili kişisel faktörlerden kaynaklanabileceği gibi çeşitli karıştırıcı faktörlerin çalışma esnasında dikkate alınmamasından kaynaklanabileceği

düşünmekteyiz. Epigenetiği etkileyen çevresel faktörleri (sigara, bilgisayar diz üstü kullanımı, terapötik ilaçlar, ağır metaller, mesleki nedenler gibi faktörler) vaka sayının az olmasından dolayı irdelenememiştir.

Çoğu çalışmalar, mitokondrilerin döllenme ve spermatozoa kalitesi için önemli olduğunu söylediklerine rağmen, mutasyonların düşük sıklığı ve işlevsel önemi, ara sıra babadan kalıtım, fenotipik etki için eşik seviyesi ve mtDNA metilasyonu gibi olaylardan etkilendiği için daha derin bir araştırmaya gerekmektir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre, astenospermik vakalarda fertil bireylerdeki spermatozoalardaki kopya sayısından %51,69 'lük mitokondri sayısı artışı, bir kompansasyon mekanizması olarak yorumlanabilir. Bununla birlikte, D-loop bölgesinin metilasyon düzeyinin astenospermik vakalardaki seviyelerinin, eşik bir değere ulaşmayıp hücre içi ATP üretiminde oluşabilecek riskli düzeylere gelmemesi olasılığı da göz önünde bulundurulabilir. Astenospermik vakalarda D-loop bölgesindeki gözlemlenen non-CpG hipermetilasyonun, mitokondri tarafından üretilen proteinler üzerindeki etkisini anlamak için, ilgili proteinlerin ekspresyon seviyelerinin araştırılması gerekmektedir. Ancak araştırma projemizin bütçesi, ilgili proteinlerin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi için yeterli değildi. Bu nedenle, D-loop bölgesindeki hipermetilasyonun hücre içi etkileri hakkında kesin bir yorum yapmak mümkün görünmemektedir.

Araştırmanın sonuçlarına ilişkin önemli bir nokta, ölçülen parametrelerdeki yüksek değişim katsayısının gözlemlenmesidir. Bu durum, ilgili parametrelerin kişiler arasında geniş bir dağılım gösterdiğini ve kişisel varyasyonların varlığını işaret edebilir. Kişilerin yaşam tarzları, sigara kullanımı, terapötik ilaçlar, hava kirliliği, diyet yağları, ağır metaller gibi faktörler bu varyasyonların ortaya çıkmasına katkıda bulunmuş olabilir.

Çalışmamız için sınırlayıcı faktörleri sıralarsak; Bunlardan biri ölçülen spermatozoa ATP düzeyleri total olup, bunun ne kadarının oksidatif fosforilasyondan ne kadarında glikolitik yoldan geldiği belirsizdir. Aynı zamanda çalışmamızda mtDNA D-loop bölgesi tarafından kontrol edilen genlerin ve bunlarla ilişkili proteinlerin ayrı ekspresyon düzeyleri değerlendirilmemiştir. Bütçesi uygun daha geniş bir çalışmada bu durum araştırılabilir. Bunların yanı sıra polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılacak bölge için seçilen bölge için azda olsa tek nükleotit polimorfizmlerinin denk gelmesi ihtimali bulunmaktadır. Bu durumda çoğalacak bölgeye özgü primerlerin mükemmel eşleşmesi olamayacağından PZR ürünün

çoğalmasında istenen düzeye ulaşılmaması ihtimali olabilmektedir. Son olarak çalışmamızdaki sonuçlarından mitokondriyal D-loop DNA'sının CpG bölgelerindeki metilasyon artışının metilasyonun artışının mitokondri fonksiyonu üzerinde bir eşik etkisi olup olmadığını da söylemek mümkün değildir.

Astenoospermisi olan infertil vakalardan elde edilen spermatozoalarının mitokondri genomunda yer alan transkripsiyon kontrol bölgesindeki Non-CpG adacıklarından ziyade CpG adacıklarındaki sitozinlerin metilasyon seviyelerinde bir artış olduğunu bulduk. Bu bulgu, spermatozoa hareket bozukluğunun mekanizmalarının açıklanmasına katkıda bulunacak çalışmalar için bize yol gösterebilir. Ayrıca, parametrelerde gözlemlenen bireysel farklılıkların nedenleri, iki bölgedeki profil farklılıkları ve mekanizma ile ilişkili diğer bileşenlerin rolünü anlamak için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Bu çalışmalar, astenospermisi olan erkeklerin üreme sağlığı ile ilgili sorunlarının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabilir.

Özetle Sonuçlarımız, astenospermisi olan infertil vakalardaki spermatozoaların mtDNA D-loop bölgesindeki CpG adacıklarındaki metilasyon düzeyinin fertil bireylere göre yüksek olduğunu göstermesine rağmen, non-CpG adacıklarındaki metilasyonun farklı olmadığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte spermatozoa hücrelerindeki olan metilasyon değişikliklerinin spermatozoa fonksiyonları ile ilişkili olmadığını göstermektedir. Farklı parametrelerde gözlemlenen bireysel farklılıkların nedenleri, iki bölgedeki profil farklılıkları ve mekanizma ile ilişkili diğer komponentlerin rolünü ortaya çıkartacak kapsamlı çalışmaların spermatozoa hareket bozuklarının mekanizmalarının açıklanmasına katkıda bulanabilir

KAYNAKLAR

1. Abd Elrahman MM, H. M. A. S. H. N. A. M., 2021. Assessment of correlation between asthenozoospermia and mitochondrial DNA mutations in Egyptian infertile men. *J Genet Eng Biotechnol*, p. 19(1):1–15.
2. Aitken RJ, S. M. W. P. R. D., 1985. Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes.. *J Reprod Fertil.*, p. 73:441–9.
3. Anderson, S. e. a., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome.. *Nature 290.5806*, pp. 457-465.
4. Arand, J., Spieler, D., Karius, T., Branco, M. R., Meilinger, D., Meissner, A., ... & Walter, J. (2012). In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLoS genetics*, 8(6), e1002750.
5. Arnberg, A., Van Bruggen, E. F. J., Ter Schegget, J., & Borst, P. (1971). The presence of DNA molecules with a displacement loop in standard mitochondrial DNA preparations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 246(2), 353-357.
6. Barres, R., Osler, M. E., Yan, J., Rune, A., Fritz, T., Caidahl, K., ... & Zierath, J. R. (2009). Non-CpG methylation of the PGC-1α promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell metabolism*, 10(3), 189-198.
7. Bellizzi, D., D'Aquila, P., Scafone, T., Giordano, M., Riso, V. I. N. C. E. N. Z. O., Riccio, A. N. D. R. E. A., & Passarino, G. I. U. S. E. P. P. E. (2013). The control region of mitochondrial DNA shows an unusual CpG and non-CpG methylation pattern. *DNA research*, 20(6), 537-547.
8. Bender, J. (2004). DNA methylation and epigenetics. Annu. Rev. *Plant Biol.*, 55, 41-68.
9. Berk, A. J., & Clayton, D. A. (1974). Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: asynchronous replication of strands, segregation of circular daughter molecules, aspects of topology and turnover of an initiation sequence. *Journal of molecular biology*, 86(4), 801-824.

10. Bhargava, K., & Spremulli, L. L. (2005). Role of the N-and C-terminal extensions on the activity of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3. *Nucleic Acids Research,* 33(22), 7011-7018.

11. Bianchessi, V., Vinci, M. C., Nigro, P., Rizzi, V., Farina, F., Capogrossi, M. C., ... & Lauri, A. (2016). Methylation profiling by bisulfite sequencing analysis of the mtDNA Non-Coding Region in replicative and senescent Endothelial Cells. *Mitochondrion,* 27, 40-47.

12. Song, B., Chen, Y., Wang, C., Li, G., Wei, Z., He, X., & Cao, Y. (2022). Poor semen parameters are associated with abnormal methylation of imprinted genes in sperm DNA. *Reproductive Biology and Endocrinology,* 20(1), 1-7.

13. Bochtler, M., Kolano, A., & Xu, G. L. (2017). DNA demethylation pathways: additional players and regulators. *Bioessays,* 39(1), 1-13.

14. Bogenhagen, D., & Clayton, D. A. (1978). Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: kinetics of synthesis and turnover of the initiation sequence. *Journal of molecular biology,* 119(1), 49-68.

15. Bowmaker, M., Yang, M. Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H. T., Huberman, J. A., & Holt, I. J. (2003). Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *Journal of Biological Chemistry,* 278(51), 50961-50969.

16. Byun, H. M., & Barrow, T. M. (2015). Analysis of pollutant-induced changes in mitochondrial DNA methylation. *Mitochondrial Medicine: Volume II, Manipulating Mitochondrial Function,* 271-283.

17. Lindholmer, C. H. (1974). The importance of seminal plasma for human sperm motility. *Biology of reproduction,* 10(5), 533-542.

18. C Castellini, C., D'Andrea, S., Cordeschi, G., Totaro, M., Parisi, A., Di Emidio, G., ... & Barbonetti, A. (2021). Pathophysiology of mitochondrial dysfunction in human spermatozoa: Focus on energetic metabolism, oxidative stress and apoptosis. *Antioxidants,* 10(5), 695.

19. Chen, W. G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A. E., Griffith, E. C., ... & Greenberg, M. E. (2003). Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science,* 302(5646), 885-889.

20. Chodavarapu, R. K., Feng, S., Bernatavichute, Y. V., Chen, P. Y., Stroud, H., Yu, Y., ... & Pellegrini, M. (2010). Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature,* 466(7304), 388-392.

21. Christman, J. K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2′-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene,* 21(35), 5483-5495.

22. Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., & Lightowlers, R. N. (2015). Response to "Ribosome rescue and translation termination at non-standard stop codons by ICT1 in Mammalian Mitochondria". *PLoS Genetics,* 11(6), e1005227.

23. Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., Pajak, A., & Lightowlers, R. N. (2011). Termination of protein synthesis in mammalian mitochondria. *Journal of biological Chemistry*, 286(40), 34479-34485.

24. Clayton, D. A. (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28(4), 693-705.

25. Cooper, T. G., Noonan, E., Von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. G., Behre, H. M., ... & Vogelsong, K. M. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human reproduction update*, 16(3), 231-245.

26. Cummins, J. (1998). Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Reviews of reproduction*, 3(3), 172-182..

27. De Martino, C., Floridi, A., Marcante, M. L., Malorni, W., Barcellona, P. S., Bellocci, M., & Silvestrini, B. (1979). Morphological, histochemical and biochemical studies on germ cell mitochondria of normal rats. *Cell and tissue research*, 196, 1-22.

28. Doda, J. N., Wright, C. T., & Clayton, D. A. (1981). Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(10), 6116-6120.

29. du Plessis, S. S., Agarwal, A., Mohanty, G., & Van der Linde, M. (2015). Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use?. *Asian journal of andrology*, 17(2), 230.

30. Ercili., B., 2021. Mitokondriyal Dna'nın D-Loop Bölgesinin Metilasyonunun Sperm Hareketi Üzerine Etkisinin Araştırılması.. *İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa.*, 61.

31. Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N. G., & Gustafsson, C. M. (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nature genetics*, 31(3), 289-294.

32. Feng, J., & Fan, G. (2009). The role of DNA methylation in the central nervous system and neuropsychiatric disorders. *International review of neurobiology*, 89, 67-84.

33. Folgerø, T., Bertheussen, K., Lindal, S., Torbergsen, T., & Øian, P. (1993). Andrology: Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Human reproduction*, 8(11), 1863-1868.

34. Frolova, L. Y., Tsivkovskii, R. Y., Sivolobova, G. F., Oparina, N. Y., Serpinsky, O. I., Blinov, V. M., ... & Kisselev, L. L. (1999). Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *Rna*, 5(8), 1014-1020.

35. Gaur, R., Grasso, D., Datta, P. P., Krishna, P. D. V., Das, G., Spencer, A., ... & Varshney, U. (2008). A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors. *Molecular cell*, 29(2), 180-190.

36. Gray, M. W., Burger, G., & Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science*, 283(5407), 1476-1481.

37. Greenberg, B. D., Newbold, J. E., & Sugino, A. (1983). Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene*, 21(1-2), 33-49.

38. Guo, J. U., Su, Y., Shin, J. H., Shin, J., Li, H., Xie, B., ... & Song, H. (2014). Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nature neuroscience*, 17(2), 215-222.

39. Holt, I. J., He, J., Mao, C. C., Boyd-Kirkup, J. D., Martinsson, P., Sembongi, H., ... & Spelbrink, J. N. (2007). Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome. *Mitochondrion*, 7(5), 311-321.

40. Iacobazzi, V., Castegna, A., Infantino, V., & Andria, G. (2013). Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool. *Molecular genetics and metabolism*, 110(1-2), 25-34.

41. Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*, 33(3), 245-254.

42. Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484-492.

43. Jurkowska, R. Z., Jurkowski, T. P., & Jeltsch, A. (2011). Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem*, 12(2), 206-222.

44. Kasamatsu, H., & Vinograd, J. (1973). Unidirectionality of replication in mouse mitochondrial DNA. *Nature New Biology*, 241(108), 103-105.

45. Kasamatsu, H., Robberson, D. L., & Vinograd, J. (1971). A novel closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. Proceedings of the National *Academy of Sciences*, 68(9), 2252-2257.

46. Koh, C. W. Q., Goh, Y. T., Toh, J. D. W., Neo, S. P., Ng, S. B., Gunaratne, J., ... & Goh, W. S. S. (2018). Single-nucleotide-resolution sequencing of human N 6-methyldeoxyadenosine reveals strand-asymmetric clusters associated with SSBP1 on the mitochondrial genome. *Nucleic acids research*, 46(22), 11659-11670.

47. Kühl, I., Miranda, M., Posse, V., Milenkovic, D., Mourier, A., Siira, S. J., ... & Larsson, N. G. (2016). POLRMT regulates the switch between replication primer formation and gene expression of mammalian mtDNA. *Science advances*, *2*(8), e1600963.

48. Björndahl, L. (2010). The usefulness and significance of assessing rapidly progressive spermatozoa. Asian Journal of Andrology, 12(1), 33.

49. Lang, B. F., Gray, M. W., & Burger, G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annual review of genetics*, 33(1), 351-397.

50. Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 204-220.

51. Lindroth, A. M., Cao, X., Jackson, J. P., Zilberman, D., McCallum, C. M., Henikoff, S., & Jacobsen, S. E. (2001). Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, 292(5524), 2077-2080.

52. Ling, M., Merante, F., Chen, H. S., Duff, C., Duncan, A. M., & Robinson, B. H. (1997). The human mitochondrial elongation factor tu (EF-Tu) gene: cDNA sequence, genomic localization, genomic structure, and identification of a pseudogene. *Gene*, 197(1-2), 325-336.

53. Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y. S., Hawkins, R. D., Nery, J. R., Hon, G., ... & Ecker, J. R. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 471(7336), 68-73.

54. Lutz, S., Weisser, H. J., Heizmann, J., & Pollak, S. (1997). A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop. *Human genetics*, *101*(3), 384-384.

55. Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*, *19*(2), 81-92.

56. Ma, H., Morey, R., O'Neil, R. C., He, Y., Daughtry, B., Schultz, M. D., ... & Mitalipov, S. (2014). Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature*, *511*(7508), 177-183.

57. Margulis, L. (1981). Symbiosis in cell evolution: Life and its environment on the early earth.

58. Blanch, M., Mosquera, J. L., Ansoleaga, B., Ferrer, I., & Barrachina, M. (2016). Altered mitochondrial DNA methylation pattern in Alzheimer disease–related pathology and in Parkinson disease. *The American journal of pathology*, *186*(2), 385-397.

59. Miki, K., Qu, W., Goulding, E. H., Willis, W. D., Bunch, D. O., Strader, L. F., ... & O'Brien, D. A. (2004). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(47), 16501-16506.

60. Montiel-Sosa, F., Ruiz-Pesini, E., Enríquez, J. A., Marcuello, A., Díez-Sánchez, C., Montoya, J., ... & López-Pérez, M. J. (2006). Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages. *Gene*, *368*, 21-27.

61. Morozov, Y. I., Agaronyan, K., Cheung, A. C., Anikin, M., Cramer, P., & Temiakov, D. (2014). A novel intermediate in transcription initiation by human mitochondrial RNA polymerase. *Nucleic acids research*, *42*(6), 3884-3893.

62. Narisawa, S., Hecht, N. B., Goldberg, E., Boatright, K. M., Reed, J. C., & Millán, J. L. (2002). Testis-specific cytochrome c-null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. *Molecular and cellular biology*, *22*(15), 5554-5562.

63. Sharma, N., Pasala, M. S., & Prakash, A. (2019). Mitochondrial DNA: Epigenetics and environment. *Environmental and molecular mutagenesis*, *60*(8), 668-682.

64. Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, *99*(3), 247-257.

65. Okano, M., Xie, S., & Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature genetics*, *19*(3), 219-220.

66. Patil, V. e. a. 2019 ,.. Human mitochondrial DNA is extensively methylated in a non-CpG context.. *Nucleic acids research 47.19* , pp. 10072-10085..

67. Patil, V., Ward, R. L., & Hesson, L. B. (2014). The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics*, *9*(6), 823-828.

68. Guldberg, P., Worm, J., & Grønbæk, K. (2002). Profiling DNA methylation by melting analysis. *Methods*, *27*(2), 121-127.

69. Pohjoismäki, J. L., Holmes, J. B., Wood, S. R., Yang, M. Y., Yasukawa, T., Reyes, A., ... & Holt, I. J. (2010). Mammalian mitochondrial DNA replication intermediates are essentially duplex but contain extensive tracts of RNA/DNA hybrid. *Journal of molecular biology*, *397*(5), 1144-1155.

70. Polosa, P. L., Deceglie, S., Roberti, M., Gadaleta, M. N., & Cantatore, P. (2005). Contrahelicase activity of the mitochondrial transcription termination factor mtDBP. *Nucleic acids research*, *33*(12), 3812-3820.

71. Posse, V., Hoberg, E., Dierckx, A., Shahzad, S., Koolmeister, C., Larsson, N. G., ... & Gustafsson, C. M. (2014). The amino terminal extension of mammalian mitochondrial RNA polymerase ensures promoter specific transcription initiation. *Nucleic acids research*, *42*(6), 3638-3647.

72. Ramsahoye, B. H., Biniszkiewicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A. P., & Jaenisch, R. (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(10), 5237-5242.

73. Reinecke, F., Smeitink, J. A., & Van Der Westhuizen, F. H. (2009). OXPHOS gene expression and control in mitochondrial disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1792*(12), 1113-1121.

74. Richter, R., Rorbach, J., Pajak, A., Smith, P. M., Wessels, H. J., Huynen, M. A., ... & Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2010). A functional peptidyl-tRNA hydrolase, ICT1, has been recruited into the human mitochondrial ribosome. *The EMBO journal*, *29*(6), 1116-1125.

75. Robberson, D. L., Kasamatsu, H., & Vinograd, J. (1972). Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *69*(3), 737-741.

76. Schapira, A. H. (2006). Mitochondrial disease. *The Lancet*, *368*(9529), 70-82.

77. Scheffler, I. (2008). Basic molecular biology of mitochondrial replication. *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction. New York: John Wiley*, 37-70.

78. Schofield, M. J., & Hsieh, P. (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annual Reviews in Microbiology*, *57*(1), 579-608.

79. Shaw, M. A., Clayton, D., Atkinson, S. E., Williams, H., Miller, N., Sibthorpe, D., & Blackwell, J. M. (1996). Linkage of rheumatoid arthritis to the candidate gene NRAMP1 on 2q35. *Journal of medical genetics*, *33*(8), 672-677.

80. Shock, L. S., Thakkar, P. V., Peterson, E. J., Moran, R. G., & Taylor, S. M. (2011). DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(9), 3630-3635.

81. Shukla, S., Kavak, E., Gregory, M., Imashimizu, M., Shutinoski, B., Kashlev, M., ... & Oberdoerffer, S. (2011). CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature*, *479*(7371), 74-79.

82. Smith, E., Jones, M. E., & Drew, P. A. (2009). Quantitation of DNA methylation by melt curve analysis. *BMC cancer*, *9*, 1-12.

83. Smith, Z. D., & Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, *14*(3), 204-220.

84. Soleimanpour-Lichaei, H. R., Kühl, I., Gaisne, M., Passos, J. F., Wydro, M., Rorbach, J., ... & Chrzanowska-Lightowlers, Z. (2007). mtRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination codons UAA and UAG. *Molecular cell*, *27*(5), 745-757.

85. Sologub, M., Litonin, D., Anikin, M., Mustaev, A., & Temiakov, D. (2009). TFB2 is a transient component of the catalytic site of the human mitochondrial RNA polymerase. *Cell*, *139*(5), 934-944.

86. Song, B., Wang, C., Chen, Y., Li, G., Gao, Y., Zhu, F., ... & Cao, Y. (2021). Sperm DNA integrity status is associated with DNA methylation signatures of imprinted genes and non-imprinted genes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *38*, 2041-2048.

87. Spencer, A. C., & Spremulli, L. L. (2004). Interaction of mitochondrial initiation factor 2 with mitochondrial fMet-tRNA. *Nucleic acids research*, *32*(18), 5464-5470.

88. Stoccoro, A., Mosca, L., Carnicelli, V., Cavallari, U., Lunetta, C., Marocchi, A., ... & Coppedè, F. (2018). Mitochondrial DNA copy number and D-loop region methylation in carriers of amyotrophic lateral sclerosis gene mutations. *Epigenomics*, *10*(11), 1431-1443.

89. Stoccoro, A., Siciliano, G., Migliore, L., & Coppedè, F. (2017). Decreased methylation of the mitochondrial D-loop region in late-onset Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *59*(2), 559-564.

90. Sujit, K. M., Sarkar, S., Singh, V., Pandey, R., Agrawal, N. K., Trivedi, S., ... & Rajender, S. (2018). Genome-wide differential methylation analyses identifies methylation signatures of male infertility. *Human Reproduction*, *33*(12), 2256-2267.

91. Tapper, D. P., & Clayton, D. A. (1981). Mechanism of replication of human mitochondrial DNA. Localization of the 5'ends of nascent daughter strands. *Journal of Biological Chemistry*, *256*(10), 5109-5115.

92. Terzioglu, M., Ruzzenente, B., Harmel, J., Mourier, A., Jemt, E., López, M. D., ... & Larsson, N. G. (2013). MTERF1 binds mtDNA to prevent transcriptional interference at the light-strand promoter but is dispensable for rRNA gene transcription regulation. *Cell metabolism*, *17*(4), 618-626.

93. Ünal, M. S., Özer, M. C., Sönmez, F. H., Bayrak, G., & Demirbağ, H. O. (2017). Seminal sıvının fertilizasyondaki rolü.

94. Urdinguio, R. G., Sanchez-Mut, J. V., & Esteller, M. (2009). Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *The Lancet Neurology*, *8*(11), 1056-1072.

95. Van Waart, J., Kruger, T. F., Lombard, C. J., & Ombelet, W. (2001). Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Human Reproduction Update*, *7*(5), 495-500.

96. Varley, K. E., Gertz, J., Bowling, K. M., Parker, S. L., Reddy, T. E., Pauli-Behn, F., ... & Myers, R. M. (2013). Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome research*, *23*(3), 555-567.

97. Vertika, S., Singh, K. K., & Rajender, S. (2020). Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility–An update. *Mitochondrion*, *54*, 26-40.

98. Veziers, J., & Lestienne, P. (1999). Organization and Expression of the Mitochondrial Genome. *Mitochondrial Diseases: Models and Methods*, 5-15.

99. Visconti, P. E., Olds-Clarke, P., Moss, S. B., Kalab, P., Travis, A. J., De Las Heras, M., & Kopf, G. S. (1996). Properties and localization of a tyrosine phosphorylated form of hexokinase in mouse sperm. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, *43*(1), 82-93.

100. Wanrooij, S., Fusté, J. M., Farge, G., Shi, Y., Gustafsson, C. M., & Falkenberg, M. (2008). Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(32), 11122-11127.

101. White, G. P., Watt, P. M., Holt, B. J., & Holt, P. G. (2002). Differential patterns of methylation of the IFN-γ promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-γ gene expression between human neonatal and adult CD45RO− T cells. *The Journal of Immunology*, *168*(6), 2820-2827.

102. Wong, M., Gertz, B., Chestnut, B. A., & Martin, L. J. (2013). Mitochondrial DNMT3A and DNA methylation in skeletal muscle and CNS of transgenic mouse models of ALS. *Frontiers in cellular neuroscience*, *7*, 279.

103. Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics*, *18*(9), 517-534.

104. Xie, W., Barr, C. L., Kim, A., Yue, F., Lee, A. Y., Eubanks, J., ... & Ren, B. (2012). Base-resolution analyses of sequence and parent-of-origin dependent DNA methylation in the mouse genome. *Cell*, *148*(4), 816-831.

105. Yasukawa, T., Reyes, A., Cluett, T. J., Yang, M. Y., Bowmaker, M., Jacobs, H. T., & Holt, I. J. (2006). Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *The EMBO journal*, *25*(22), 5358-5371.

106. Zeviani, M., Servidei, S., Gellera, C., Bertini, E., DiMauro, S., & DiDonato, S. (1989). An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature*, *339*(6222), 309-311.

107. Zhang, H., & Pommier, Y. (2008). Mitochondrial topoisomerase I sites in the regulatory D-loop region of mitochondrial DNA. *Biochemistry*, *47*(43), 11196-11203.

108. Zhang, W., Li, M., Sun, F., Xu, X., Zhang, Z., Liu, J., ... & Du, J. (2019). Association of sperm methylation at LINE-1, four candidate genes, and nicotine/alcohol exposure with the risk of infertility. *Frontiers in Genetics*, *10*, 1001.

109. Ziller, M. J., Müller, F., Liao, J., Zhang, Y., Gu, H., Bock, C., ... & Meissner, A. (2011). Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types. *PLoS genetics*, *7*(12), e1002389.

FORMLAR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ CERRAHPAŞA	**GÖNÜLLÜ ONAM FORMU***

Tarih:

Sizi.....merkezinde. .....yürütücülüğünde gerçekleştirilecek olan ....başlıklı projeye davet ediyoruz. Siz bu araştırmanın gönüllü grubu içinde yer alacaksınız. Sizden ve diğer katılımcılardan elde edilecek bilgiler veya verilerle bilimsel bir sonuca ulaşılacaktır. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce araştırmanın niçin, nasıl, ne yöntemle yapılacağı ve sizden ne istendiği katılmanın size getireceği faydaları, riskleri ve rahatsızlıkları bilmeniz gerekmektedir.

Bu nedenle, bu formun okunup anlaşılması önemlidir. Anlamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa açıklanmasını talep ediniz. Araştırmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama veya katıldıktan sonra çıkma hakkına sahipsiniz. Proje ile ilgili olarak aşağıdaki konularda özellikle bilgi alınız:

- Projenin niteliği,
- Amacı,
- Bilime katkıları,
- Yapılacak işlem (kan alma, anket vb.),
- Nasıl uygulanacağı,
- Hangi yöntem/yöntemlerle gerçekleştirileceği (intravenöz, soru, röportaj vb.),
- Süresi,
- Yaklaşık katılımcı sayısı (Çok merkezli ise toplam katılımcı kurum ve katılımcı sayısı).
- Riskler, ortaya çıkabilecek istenmeyen etkiler ve tedavi edilebilirliği,

Bu proje kapsamında yapılacak her türlü işlem için sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecektir. Bu proje sizin sosyal güvenli kurumu veya diğer sağlık sigortası kuruluşlarıyla ilgili ödemelerinize herhangi bir yük getirmeyecektir.

Sonuçlarınız ve kimliğiniz gizli tutulacaktır. Ancak istemeniz halinde elde edilen sonuçlar rapor halinde size verilecektir.

***BU FORM HASTANIN ANLAYABİLECEĞİ BİR DİLLE, TIBBİ TERİMLERDEN KAÇINILARAK YAZILMALIDIR.**

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MİTOKONDRİYAL DNA'NIN KONTROL BÖLGESİNDEKİ OLASI NON-CpG METİLASYONLARİN SPERM HAREKETİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%8	%7	%3	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%2
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
3	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<%1
4	P. Piomboni. "The role of mitochondria in energy production for human sperm motility : Mitochondria functionality in human spermatozoa", International Journal of Andrology, 04/2012 Yayın	<%1
5	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
6	Ghosh, Sourav, Keshav K. Singh, Shantanu Sengupta, and Vinod Scaria. "Mitoepigenetics:	<%1