



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TÜRK TOPLUMUNDAKİ KADINLARDA FSHR
POLİMORFİZMLERİ VE C566T MUTASYONUNUN
FERTİLİTE ÜZERİNE ETKİSİNİN ANALİZİ**

Nermin Seda ILGAZ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç.Dr.O. Sena AYDOS

2010- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRK TOPLUMUNDAKİ KADINLARDA FSHR
POLİMORFİZMLERİ VE C566T MUTASYONUNUN
FERTİLİTE ÜZERİNE ETKİSİNİN ANALİZİ**

Nermin Seda ILGAZ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç.Dr. O. Sena AYDOS**

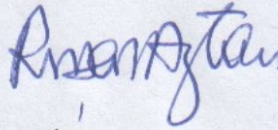
2010- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı

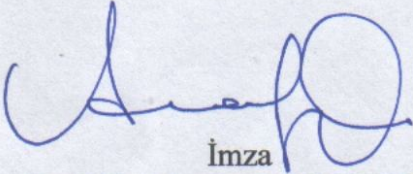
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02 / 09 / 2010



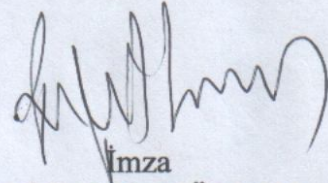
İmza

Prof. Dr. Ruşen AYTAÇ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.
Jüri Başkanı



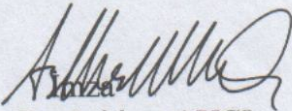
İmza

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D.
Raportör



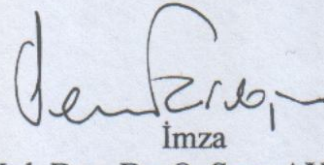
İmza

Prof. Dr. Rifat GÜRSOY
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.



İmza

Doç. Dr. Aslıhan AVCI
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya A.D.



İmza

Yrd. Doç. Dr. O. Sena AYDOS
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Menstrual Döngü ve Nöroendokrin Kontrolü	2
1.1.1. Folliküler Faz	2
1.1.2. Ovulasyon	9
1.1.3. Luteal Faz	11
1.1.4 Menstrual Faz	11
1.2 Follikül Stimüle Edici Hormon Reseptör	12
1.2.1 FSHR' nün Moleküler Yapısı	13
1.2.2 FSH Reseptör Geninin Promotoru	20
1.2.3 FSHR Genetik Varyasyonu ve İnfertilite	24
2. GEREÇ ve YÖNTEM	29
2.1 Çalışma Grubu	29
2.2. Polimorfik Özelliklerin Belirlenmesi	30
2.2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal	
Malzemeler ve Solüsyonlar	30
2.2.1.1 Periferik Kandan DNA İzolasyonu	30

2.2.1.2	Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile DNA amplifikasyonu	30
2.2.1.3.	Polimeraz Zincir Reaksiyonunda kullanılan primer diziler	31
2.2.1.4.	Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmlerinde kullanılan enzimler	31
2.2.1.5.	Agaroz Jel Elektroforezi	31
2.2.2.	DNA İzolasyonu ve Kantitasyonu	32
2.2.3.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu	33
2.2.4.	RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	35
2.2.5	Sonuçların Değerlendirilmesi	38
3.	BULGULAR	39
3.1.	-29G/A Polimorfizmi	40
3.2.	Ala307Thr Polimorfizmi	43
3.3.	Ser680Asn Polimorfizmi	45
3.4.	Ala189Val mutasyonu	48
3.5.	Haplotip Analizi	49
4.	TARTIŞMA	52
4.1.	-29 Polimorfizmi	53
4.2.	Ala307Thr ve Ser680Asn Polimorfizmi	54
4.3.	C566T Mutasyonu	61
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	64
	Özet	66
	Summary	67
	KAYNAKLAR	68
	Ekler	72
	Ek-1	72

Ek-2	74
Ek-3	76
ÖZGEÇMİŞ	78

ÖNSÖZ

Türk toplumundaki kadınlarda FSHR polimorfizmleri ve C566T mutasyonunun fertilite üzerine etkisinin araştırıldığı bu tez çalışmasına 50 primer infertil kadın hasta ve 50 sağlıklı fertil kadın birey katılmıştır. Çalışmamızda FSH reseptör polimorfizmleri ve mutasyonunun, FSH seviyeleri ve infertilite ile arasında bir ilişki saptanmamıştır; ancak -29GG-G919A-G680A haplotipinin fertilitenin korunmasında önemli olabileceği gözlemlenmiştir.

Bu tez çalışmasını hazırlamam esnasında bana her türlü olanağı sağlayan ve önerileri ile beni yönlendiren danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Sena AYDOS'a, çalışmam sırasında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na, ayrıca bu tez çalışması sırasında her zaman yanımda olup yardımcı olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı asistanları ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana doğru yolu gösterip her zaman destekleyen babama, anneme ve kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

β-HCG	Koryonik Gonadotropin
1,2,-DG	1,2-diaçilgliserol
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartik asit
ATP	Adenozin trifosfat
Cys	Sistein
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
c-ETS	c-E- <i>twenty-six</i> (c-ETS) transkripsiyon faktörü
COOH	Karboksil grubu
CRE	Siklik AMP cevap elementleri
CREB proteinleri	Siklik AMP cevap elementleri bağlanma proteinleri
CREM	Siklik AMP cevap elementleri modülatörleri
C-terminal	Karboksi terminal
D	Aspartik asit
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
E2F	E2F transkripsiyon faktörü
E	Glutamik asit
ER	Endoplazmik retikulum
ERGIC	ER-Golgi ara kompleksi

FSH	Folikül stimüle edici hormon
FSHR	FSH reseptörü
Glu	Glutamik asit
GnRH	Gonadotropin salgılayan hormon
GPCR	G protein çifti reseptör
GpH	Glikoprotein hormon
GpHR	Glikoprotein hormon reseptörü
HCl	Hidroklorik asit
His	Histidin
Ile	İzolosin
InR	Initiatör
IP3	İnoзитol trifosfat
K	Lizin
L	Lösin
Leu	Lösin
LH	Luteinze edici hormon
LHR	LH reseptörü
LI	Lüteinizasyon İnhibitörü
LRR	Lösin zengini tekrarlar
Lys	Lizin
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MSC-1	Mouse Sertoli cell (Fare sertoli Hücreleri)
NaCl	Sodyum klorür
NH ₂	Amino grubu

N-terminal	Amino ucu
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
OMİ	Oosit maturasyon inhibitörü
QCS	ER kalite kontrol sistemi
P450c	Sitokrom <i>P450c</i>
P450c17	Sitokrom <i>P450c17</i>
P450scc	Kolesterol yan zincir klivajı enzimi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Phe	Fenilalanin
PKA	Protein kinaz A
R	Arginin
RFLP	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmleri
S	Serin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Ser	Serin
SF-1	Steroidogenik faktör 1
SLBS	SF-1-benzeri bağlanma bölgesi
TBE	Tris-Borik Asit EDTA tampon (TBE)
TE	Tris-EDTA tamponu
Thr	Treonin
TM	Transmembran bölge
TNP	Tek nükleotid polimorfizmi
TSH	Tirotropik hormonu (Tiroid stimüle edici hormon)
TSHR	TSH reseptörü
Tyr	Tirozin
Val	Valin

ŞEKİLLER

Şekil 1.1	Primordiyal folikülden olgun foliküle doğru gelişen ovaryum folikülleri	3
Şekil 1.2	Folikül östrojen sentezinde ‘ iki hücre iki gonadotropin’ teorisinin şeması	6
Şekil 1.3	Folikül rüptürü	10
Şekil 1.4	İnsan FSHR genin yapısal organizasyonu	13
Şekil 1.5	G protein çifti reseptörü genel yapısı	14
Şekil 1.6	FSHR-FSH kristal yapısının genel görünüşü	15
Şekil 1.7	Reseptör hormon interaksyonu	16
Şekil 1.8	Reseptör aktivasyon aşamaları	17
Şekil 1.9	GPCR Transmembran bölge	19
Şekil 1.10	FSHR gen promotor bölgesi	21
Şekil 1.11	cAMP sistemi	23
Şekil 3.1.	Hasta grubunun yaş dağılım yüzdeleri	39
Şekil 3.2.	-29G/A Polimorfizmi için tespit edilen genotiplerin yüzdelerik dağılımı	41
Şekil 3.3.	-29G/A polimorfizmi için tespit edilen alellerin %2’ lika garoz jel görüntüsü	42
Şekil 3.4.	307G/A Polimorfizmi için tespit edilen genotiplerin yüzdelerik dağılımı	43
Şekil 3.5.	Ala307Thr polimorfizmi için tespit edilen alellerin % 2’ lik agaroz jel	45
Şekil 3.6.	680G/A Polimorfizmi için tespit edilen genotiplerin yüzdelerik dağılımı	46

- Şekil 3.7.** Ser680Asn polimorfizmi için tespit edilen alellerin
% 2' lik agaroz jel görüntüsü 47
- Şekil 3.8.** Ala189Val mutasyonu için tespit edilen alellin
% 2' lik agaroz jel görüntüsü 48

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Periferik kandan DNA izolasyonu için kullanılan reaktif maddeler	30
Çizelge 2.2.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılan reaktif maddeler	30
Çizelge 2.3.	Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler	31
Çizelge 2.4.	G29A aleli için PCR şartları	33
Çizelge 2.5.	Ala307Thr aleli için PCR şartları	34
Çizelge 2.6.	Ser680Asn alelleri için PCR şartları	34
Çizelge 2.7.	Ala189Val alelleri için PCR şartları	35
Çizelge 2.8.	G29A aleli için RFLP şartları	36
Çizelge 2.9.	Ala307Thr aleli için RFLP şartları	36
Çizelge 2.10.	Ser680Asn aleli için RFLP şartları	36
Çizelge 2.11.	Ala189Val aleli için RFLP şartları	37
Çizelge 2.12.	FSHR alellerinin RFLP modelleri ve genotipler	38
Çizelge 3.1.	Hasta grubunun yaş ve evlilik süreleri	39
Çizelge 3.2.	Hasta grubunun hormon değerleri ve vücut kitle indeksi	40
Çizelge 3.3.	-29G/A Polimorfizmi için tespit edilen genotipler	40
Çizelge 3.4.	-29G/A Polimorfizmi için tespit edilen aleller	41
Çizelge 3.5.	-29G/A polimorfizm genotipi ve hormon değerleri	42

Çizelge 3.6.	307G/A Polimorfizmi için tespit edilen genotipler	43
Çizelge 3.7.	307 G/A Polimorfizmi için tespit edilen aleller	44
Çizelge 3.8.	Ala307Thr polimorfizm genotipi ve hormon değerleri	44
Çizelge 3.9.	680 G/A Polimorfizmi için tespit edilen genotipler	45
Çizelge 3.10.	680 G/A Polimorfizmi için tespit edilen aleller	46
Çizelge 3.11.	Ser680Asn polimorfizm genotipi ve hormon değerleri	47
Çizelge 3.12.	189 C/T Mutasyonu için tespit edilen aleller	48
Çizelge 3.13.	FSH Reseptör G919A-G2039A Haplotiplerinin Hasta ve Kontrol Bireyler Arasındaki Dağılım Sıklıkları	49
Çizelge 3.14.	FSH Reseptör -29G/A-G919A-G2039A Haplotiplerinin Hasta ve Kontrol Bireyler Arasındaki Dağılım Sıklıkları	50
Çizelge 3.15.	-29GG-G919A-G2039A haplotipinin frekansı	51

1.GİRİŞ

Kadınlarda normal reproduktif fonksiyon, tekrarlayan follikül gelişimini, ovulasyon sikluslarını ve endometriumun implantasyona hazırlanmasını içerir. Düzenli ovulatuvar sikluslar, hipotalamus, hipofiz ve overden gelen uyarıcı ve inhibe edici sinyallerin düzenli gerçekleşmesi ile sağlanır (Strauss ve Barbieri, 2006).

Hormon terimi ilk kez Bayliss ve Starling tarafından ortaya atılmıştır. Hormonlar, vücudun bir bölgesinde yapımını takiben dolaşım yolu ile uzak organ ve dokulara geçerek onların yapı ve işlevini etkileyen kimyasal maddelerdir. Şu ana kadar saptanan tüm hormonlar her iki cinsten de bulunmaktadır. Cinsiyet farklılığını yaratan bir hormonun varlığı ya da yokluğu değil, o hormonun miktarında ve salınım düzeninde olan değişikliklerdir. Üreme sisteminin çalışması, overler ve testislerden gerekli hormonların salınımını sağlayan uygun bir genetik programlamaya bağlıdır. Hormonlar dolaşımında oldukça düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Düşük konsantrasyonlarda bulunan hormonlar, hedef dokularda, hormona yüksek afinite ile bağlanan spesifik reseptörler ile hedef dokulara yönelirler. Üreme fonksiyonu, gonadlarda steroid sentezi ve gametogenezi düzenleyen hipofiz (pitüiter) kaynaklı gonadotropinler, FSH, LH ve bu iki hormonun çeşitli şekillerde regüle edilmesi ile kontrol edilir (Bükülmez ve Arıcı, 1996).

Ergenlik ve menopoz arasındaki dönemde yumurtalık, hipotalamus-hipofiz aksının kontrolünde periyodik aktivite gösterir. Hipotalamustan gonadotropin-salgılayan hormon (GnRH), hipotalamus-hipofiz portal damarlarına pulsatil olarak salgılanır. GnRH kontrolü altında hipofizin gonadotrop hücreleri pulsatil olarak lüteinize edici hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormonu (FSH) salgılar (Buffet ve Bouchard, 2001). FSH ve LH, overlerdeki follikül gelişimini, ovulasyonu, korpus luteum oluşumunu ve östrojen, progesteron, inhibin A ve inhibin B'nin koordineli salınımını uyarır. FSH sekresyonunun negatif geri bildirim etkileriyle baskılanması, tek bir matür oosit gelişimi için önemlidir. Menstrüel siklusun folliküler fazı; adetinin birinci günü

başlar, çok sayıda follikülün ön seçimi, dominant follikülün ortaya çıkışı ve endometrial proliferasyon dönemlerini içerir ve preovulatuvar LH ani artış günü sona erer. LH'daki ani artıştan bir gün sonra başlayan luteal faz, korpus luteum formasyonu, progesteron salınımı ve endometriumda ilk önce implantasyon hazırlığı, gebelik oluşmadığı takdirde, korpus luteumun gerilemesiyle birlikte kan desteğinin kaybı ve kalınlaşan endometrium dokusunun atılması ile karakterize menstrüasyon gibi koordineli seri değişikliklerle karakterizedir (Strauss ve Barbieri, 2006).

1.1. Menstrual Döngü ve Nöroendokrin Kontrolü

Menstrual siklus düzenli aralıklarla görülen siklik adetlerle karakterizedir. Adetlerin düzenliliği hipotalamus, hipofiz (pituitör bez) ve over arasındaki koordinasyona ve buna bağlı olarak hedef organ endometriumda meydana gelen siklik değişikliklere bağlıdır. Her döngü adet 1.günü başlar ve bir sonraki adet başlayacağı gün öncesi biter. Ortalama döngü 28 gündür (Kutlukhan, 1996).

Siklus esnasında preovulatuvar dönemde overde meydana gelen değişiklikler sürecine folliküler faz, endometriumda meydana gelen değişiklikler sürecine proliferatif faz denilirken, overde postovulatuvar fazda meydana gelen değişiklikler sürecine luteal faz, endometriumda meydana gelen değişiklikler sürecine sekretuar faz denilmektedir.

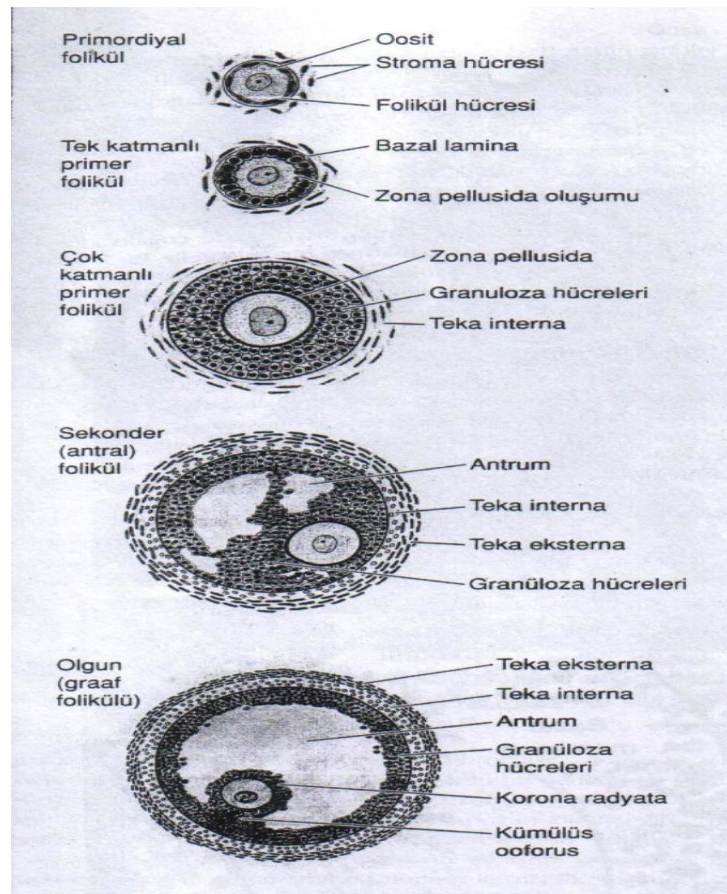
Bir siklusa birbirini izleyen 4 faz vardır:

- 1) Folliküler faz (Proliferatif)
- 2) Ovulasyon
- 3) Luteal faz (Sekretuar)
- 4) Menstrüel faz (Sivaslıoğlu, 2004)

1.1.1 Folliküler Faz

Folliküler faz sırasında ovulasyon için uygun sayıda follikülün oluşması için bir seri olay gerçekleşmektedir. İnsan yumurtalığında folliküler gelişim sonucunda

(genelde) 1 tane yaşayan olgun follikül oluşmaktadır. 10-14 gün süren bu süreçte primordial follikül, preantral, antral ve preovuluar follikül süreçlerinden (Şekil1.1) geçmektedir (Speroff ve ark., 2005). Büyümeye başlayan folliküllerin ortaya çıkma zamanı bir önceki siklusta korpus luteumun regresyonundan sonraki birkaç gün içerisinde olur. Bu dönemde progesteron, östradiol ve inhibin düzeyleri düşer. Bu düşüşe bağlı olarak da yeni gonadotropin sistemi aktive olur. Bu fizyolojik aktivasyon sonucunda FSH ve LH düzeylerinde artış meydana gelmektedir (Sivaslıoğlu, 2004).



Şekil 1.1 Primordiyal follikülden olgun folliküle doğru gelişen ovaryum follikülleri (Junqueira ve Carneiro, 2006)

Primordial Follikül: Primordial germ hücreleri, vitellus (yolk) kesesinin endoderm hücreleri, allantois ve embriyonun hindgut kısmından köken alır ve gebeliğin 5-6. haftasından itibaren genital kabartıya göç eder. Gebeliğin 6-8. haftalarında germ hücrelerinin seri bir şekilde mitotik çoğalması gerçekleşir ve 16-20. haftalarda her bir

yumurtalıkta 6-7 milyon oosite ulaşılır. Primordial follikül, mayotik profazın diploten aşamasında areste uğramış ve tek tabakalı iç şeklinde (yassı) granüloza hücreleri ile çevrili bir oosit içermektedir. Gebeliğin 16-20. haftalarında maksimum sayıda bulunan oositler geri döndürülemez şekilde azalır. En hızlı azalma doğumdan önce gerçekleşir ve 6-7 milyon olan oosit sayısı doğumda 1-2 milyon, ergenlikte ise 300.000'e kadar iner. Bir kadının reproduktif yaşamı süresince bu geniş havuzdan sadece 400-500 kadar follikül ovule olmaktadır. Primordial gelişim sırasında oosit büyür ve granüloza hücreleri iç şeklinden kübik (küboid) hale dönüşür. Bu olaylar gerçekleşirken granüloza hücreleri ve oosit arasında 'gap junction' denen bağlantı noktaları oluşur. Bu bağlantı noktaları sayesinde granüloza hücreleri ve oosit arasında besin ve metabolit değişimi gerçekleşir (Speroff ve ark., 2005). Primordial follikül içindeki oosit yaklaşık 25µm çapında, küre biçiminde bir hücredir. Bu hücreler mayoz bölünmenin birinci profaz evresindedir (Junqueira ve Carneiro, 2006). Küboid granüloza hücrelerinin çoğalması ile birlikte primordial follikül primer folliküle dönüşür. Granüloza tabakası stromal tabakadan 'bazal lamina' denen bir tabaka ile ayrılır. Zona pellusida ortaya çıkar. Folliküler gelişimin başlaması gonadotropinlerden bağımsız olarak meydana gelmektedir. Bu gelişimin büyük çoğunluğu sınırlandırılır ve atrezi ile devam eder. Sınırlandırılan gelişme ve atrezinin bir kısmı, menstrual siklusun başında, bir grup follikül hormonal değişimlere cevap verdiğinde kesintiye uğrar. Bu dönemdeki en önemli hormonal olay 'FSH' seviyesindeki artıştır. Luteal faz steroidogenezinde ve inhibin sekresyonundaki azalma FSH artışına izin verir dolayısı ile folliküllerin bir kısmı atreziden kurtulur (Sivaslıoğlu, 2004; Speroff ve ark., 2005).

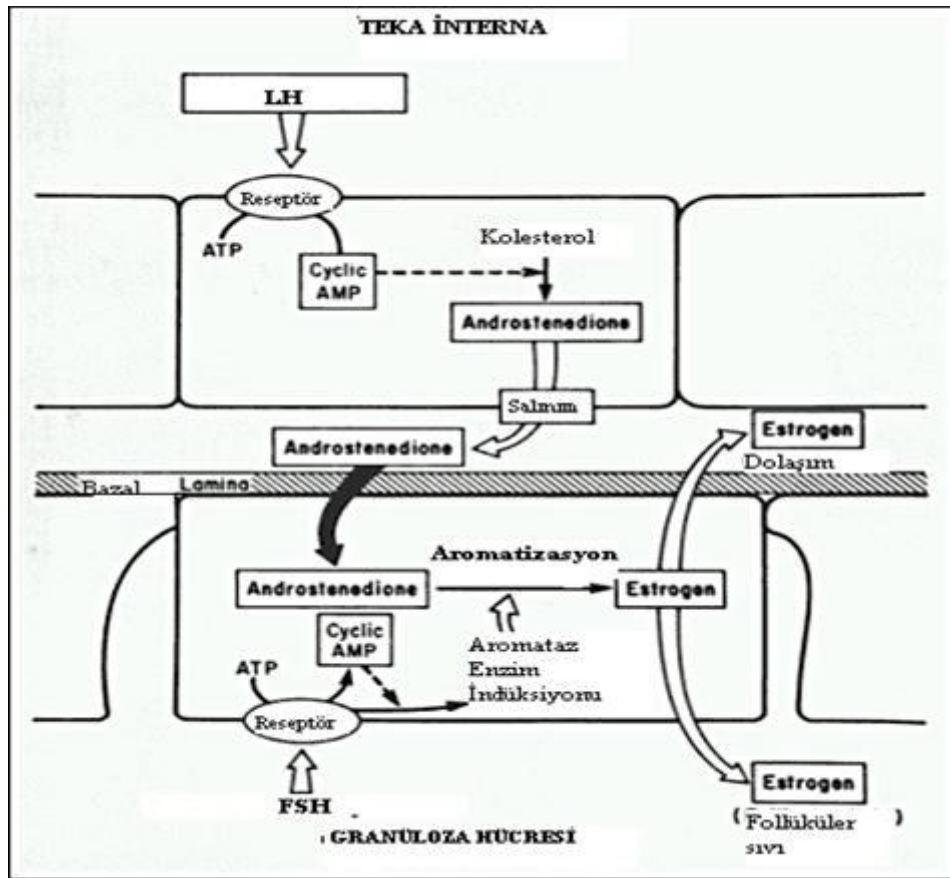
Preantral Follikül: Büyüme bir kez başladığında follikül preantral aşamaya geçer. Bu sırada granüloza hücreleri proliferasyon olarak çok katlı bir tabaka meydana getirirken, teka tabakası da stromadan farklılaşmaya (organize) devam eder, teka interna ve teka eksterna olarak ayrışır. Bu büyüme gonadotropinlere bağımlıdır ve artan östrojen üretimi ile korelasyon gösterir. Preantral folliküllerin granüloza hücreleri, androjen, progesteron ve östrojen olmak üzere 3 tip steroid sentezler, ancak progesteron ve androjene oranla daha fazla östrojen üretilir. Bir aromataz enzim sistemi androjenleri östrojene çevirmektedir. Aromatizasyon FSH aracılığı ile

indüklenir veya aktive edilir. FSH'nin reseptörüne bağlanması ve adenilat siklaz aracılı sinyalin aktivasyonu, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve fonksiyonundan sorumlu proteinleri kodlayan mRNA ekspresyonu tarafından takip edilir. Buna göre FSH, hem granüloza hücrelerinde steroidogenezi (östrojen sentezi) hem de granüloza hücre büyümesini ve proliferasyonunu başlatmaktadır. FSH'nin spesifik reseptörleri preantral sürece kadar granüloza hücre yüzeyinde bulunmaz ve preantral follikül sınırlı miktardaki androjeni aromatize ederek kendi östrojenik mikroçevresini oluşturmak için FSH varlığına ihtiyaç duyar. Östrojen üretimi bu şekilde FSH reseptör içeriği ile de sınırlanmaktadır. FSH reseptörleri granüloza hücrelerinin plazma membranında follikülün büyümeye başladığı anda belirir ve hızlıca her bir granüloza hücresinde 1500 reseptör olacak konsantrasyona ulaşır (Sivaslıoğlu, 2004; Speroff ve ark., 2005)..

Antral Follikül: Östrojen ve FSH'nin sinerjetik etkisi ile granülozanın intrasellüler boşluğunda biriken folliküler sıvı üretiminde artış meydana gelir, bir boşluk oluşur ve follikül antral aşamaya geçer. Folliküler sıvı birikimi, her follikülün spesifik mikroçevresinde oosit ve çevresindeki granüloza hücrelerinin beslenmesini sağlar. FSH varlığında, östrojen, FSH yokluğunda ise androjen folliküler sıvıda baskın hale gelir. LH, normalde siklus ortasına (mid-cycle) kadar folliküler sıvıda bulunmaz. Eğer LH plazmada ve antral sıvıda zamanından önce artarsa granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır, dejeneratif değişimler gerçekleşir ve intrafolliküler androjen seviyeleri yükselir. Bu nedenle FSH ve östrojenin dominant olması granüloza hücrelerinin aralıksız proliferasyonu ve folliküler gelişme için gereklidir. Granüloza hücre proliferasyonu yüksek olan antral folliküllerde, yüksek östrojen konsantrasyonu ve düşük androjen/östrojen oranı vardır. Bu durum sağlıklı oosit için gereklidir. Androjenik çevre östrojenin indüklediği granüloza proliferasyonunu azaltır, eğer devam ederse oositte dejeneratif değişimleri tetikler.

Steroid hormonların sentezi follikül içinde bölümlere ayrılır. Bu durumu “iki hücre iki gonadotropin sentez sistemi” açıklar.

İki Hücre İki Gonadotropin Sistemi: İnsan preantral ve antral foliküllerinde LH reseptörleri sadece teka, FSH reseptörleri ise sadece granüloza hücre yüzeylerinde bulunur. Tekal intersititial hücreler teka internada bulunur ve membranlarında yaklaşık 20000 LH reseptörü vardır. LH'ya cevapta tekal dokular FSH'nın indüklediği aromatzasyon aracılığı ile östrojene çevrilecek androjenleri üretmek için uyarılır (Speroff ve ark., 2005). (Şekil 1.2)



Şekil 1.2 Follikül östrojen sentezinde ‘iki hücre iki gonadotropin’ teorisinin şeması (Kutlukhan, 1996)

Follikül geliştikçe teka hücreleri LH reseptörü, P450scc ve 3 β -hidroksisteroid dehidrojenaz için gereken genleri eksprese etmeye başlar. Kolesterolün LH tarafından düzenlenen mitokondriye girişi steroidogenez için gereklidir. Dolayısı ile yumurtalık steroidogenezi her zaman LH-bağımlı gerçekleşmektedir (Speroff ve ark., 2005).

Dominant Follikül Seçimi: Östrojene başarılı bir çevirim, ovulasyon için follikülü işaretler. Bu seçim sonucunda istisnalar dışında sadece tek bir follikül başarılı olur. Bu seçim olayı FSH'nın salınımında östrojenin hipofiz üzerindeki etkisi ile gerçekleşir. Östrojen olgunlaşan follikülde FSH üzerinde pozitif etki gösterirken, negatif geri bildirim sayesinde, hipotalamus-hipofiz seviyesinde, daha az gelişmiş olan foliküllerden gonadotropin desteğini çeker. FSH'daki azalma, daha az gelişmiş olan folliküllerde FSH-bağımlı aromataz aktivitesini azaltır, östrojen üretimini sınırlandırır. Az gelişen follikül östrojen mikroçevreyi sağlasa bile azalan FSH desteği granüloza proliferasyonunu ve fonksiyonunu engellerken, androjenik mikroçevreye dönüşümü arttırır, böylece geri dönüşümsüz olan atretik değişim indüklenir. Atrezide gerçekleşen ilk olay granüloza tabakasındaki FSH reseptörünün azalmasıdır. Östrojenin FSH üzerindeki negatif geri bildirimi dominant follikül dışındaki tüm folliküllerin gelişimini inhibe eder. Seçilmiş olan follikül FSH'a bağımlıdır ve azalan FSH plazma seviyeleri karşısında preovulatuvar gelişimini tamamlamalıdır. Dominant follikülün iki önemli avantajı vardır. *i)* Granüloza proliferasyon oranından dolayı FSH reseptör içeriği fazladır *ii)* Lokal parakrin/otokrin peptidlerce FSH etkisi güçlenmektedir. Dolayısı ile aromatisasyonun uyarılması devam ederken, aynı zamanda daha az gelişen folliküllerden FSH geri çekilir ve daha az gelişen foliküller atreziye uğrar. Granüloza hücrelerindeki boşluğun artmasına tekal damarlanma (vaskülarizasyon) eşlik eder. 9. günden itibaren dominant folliküldeki tekal damarlanma antral folliküldekinin iki katıdır. Bu olay gonadotropinlerin folliküle seçilimli aktarımına izin verir, dominant follikülün FSH'a cevap verme yeteneğini devam ettirir ve azalan gonadotropin seviyelerine karşın gelişim ve fonksiyon devam eder. Ovulatuvar artışa cevap vermek ve başarılı bir korpus luteum olmak için granüloza hücreleri LH reseptörlerine sahip olmak zorundadır. Büyük antral follikülün granüloza hücrelerinde FSH, LH reseptör gelişimini indükler. Burada otokrin/ parakrin peptidler ve östrojen ana kordinatördür. Follikül içinde artan östrojen konsantrasyonu ile FSH, LH reseptör üretimine odaklanır (Speroff ve ark., 2005).

Östrojen ve peptid üretimi aracılığı ile dominant follikül kendi kaderini kendi belirler. Geri bildirim mekanizmaları aracılığı ile gonadotropin sekresyonundaki

değişim follikülün çevresini daha az gelişmiş olan folliküller için zararlı hale getirir. GnRH gonadotropin sekresyonunun kontrolünde önemli role sahiptir, ancak menstrual döngüde gerçekleşen gonadotropin sekresyonu dominant follikülden köken alan hipotalamus ve anterior hipofiz aracılığı ile etkili olan steroid ve peptidlerin geri bildirimli değişimlerinin sonucudur. GnRH'daki artış LH artışına eşlik eder bu da östrojenin pozitif geri bildiriminin hem hipofiz hem de hipotalamik bölgelere etki ettiğini göstermektedir. Östrojen inhibitör etkisi hem GnRH'ın pulsatil sekresyonunu hem de GnRH hipofiz cevabını azaltarak hem hipotalamus hem de anterior hipofizi etkilemektedir. FSH sekresyonu östrojenin negatif inhibitör etkisine karşı son derece duyarlıdır. Yüksek seviyelerde östrojen inhibin ile bir araya gelerek FSH'ı baskılar (Speroff ve ark., 2005).

Preovulatuvar Follikül: Preovulatuvar folliküldeki teka hücreleri vakuolize olurken granüloza hücreleri büyür ve preovulatuvar folliküle hiperemik bir görünüm kazandırır. Oosit mayoza devam eder. Preovulatuvar follikül artan miktarlarda östrojen üretir. Geç foliküler faz sırasında östrojen önce yavaşça artar daha sonra ovulasyondan 24-36 saat önce pik yapar. Östrojen en üst seviyeye ulaştığında LH seviyesi artar. Seçilen foliküle ovulatuvar uyarı sağlamak için, LH artışı geri kalan östrojen ve FSH içeriği düşük, androjen miktarı fazla olan foliküllerin kaderini belirler. LH kendi reseptörü aracılığı ile dominant folliküldeki granüloza hücrelerindeki lüteinizasyonu arttırır ve progesteron üretimi gerçekleşir. LH reseptörü bir kez eksprese edildiğinde hücre büyümesi inhibe edilir, steroidogenez ile enerji üretimine odaklanılır. Progesteron, östrojene pozitif geri bildirim etkisini zamana ve doza bağlı olarak gösterir. Yeterli miktarda östrojen primingden sonra progesteron pozitif geri bildirim cevabını hipofiz üzerinde direk bir etki ile kolaylaştırır ve estradiolün eşik altı değerlerde bulunması LH artışını indükleyebilir. (Bir hormon, diğer bir hormona olan duyarlılığı artırabilir. Buna priming denir. Östrojenler, miyometrium ve endometriumdaki progesteron reseptörlerinin sayısını artırır.) LH üzerindeki kolaylaştırıcı etkisinin yanında progesteron siklus ortasındaki FSH artışından da sorumludur. Progesteronun bu hareketi folikül üzerinde FSH etkisinin tamamlandığını göstermektedir. Preovulatuvar süreç, plazma 17α -hidroksiprogesteron seviyelerinin artışı ile ilişkilidir. 17α -hidroksiprogesteron teka

androjen üretimi için önemli olan P450_{scc} ve P450_{c17} enzimlerinin LH uyarımının işaretidir. Ovulasyondan sonra bazı teka hücreleri lüteinize olarak korpus luteumun parçası olur ve P450_{c17} eksprese etme özelliğini kaybeder. Diğer lüteinize teka hücreleri P450_{c17} aktivitesini korur ve östrojene aromatisasyon için androjen üretmeye devam eder. Daha az gelişen foliküller atreziye uğradıklarında teka hücreleri stromal dokunun komponenti olmaya devam eder ancak P450 aktivitesi ile LH cevabına ve steroid üretme kabiliyetlerine sahiptirler. İntraovaryan androjen, granüloza hücre ölümünü ve folliküler atreziyi hızlandırır. Buna göre androjenlerin ovulasyon için tek bir dominant follikül gelişmesinde düzenleyici rolleri vardır (Speroff ve ark., 2005).

1.1.2. Ovulasyon

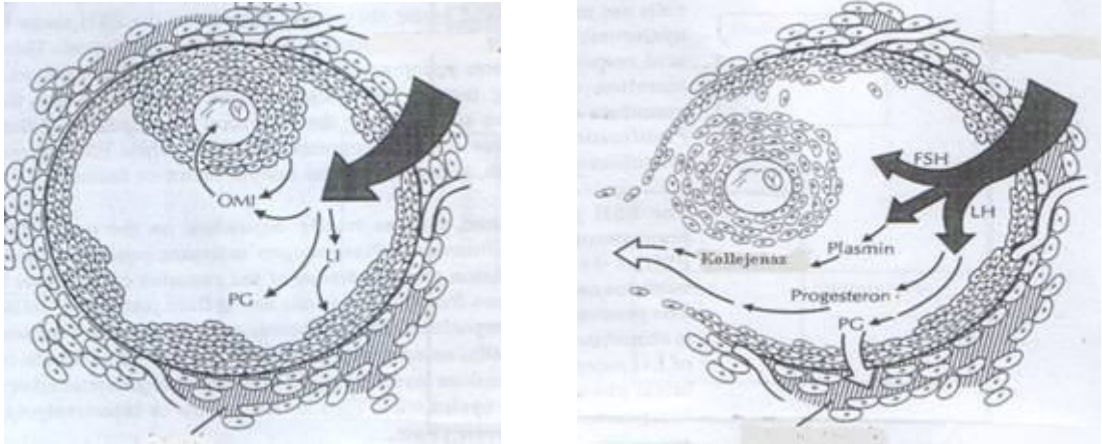
Östrojenle olgunlaşmasından sonra preovulatuvar follikül kendi ovulatuvar uyarımına sahiptir. Ovulasyon LH pikinden 10-12 saat ve östradiol pikinden 24-36 sonra gerçekleşir. LH artışı ovulasyonun en güvenilir göstergesidir ve follikül çatlamasından 34-36 saat önce gerçekleşir. Gonadotropin artışı ovulasyon, oositin salınması ve granüloza hücrelerinin kümülüs yığına neden olan olayları uyarır (Speroff ve ark., 2005).

Oluşan dominant follikül az miktarda progesteron salgılamaya başlar. Az miktarda salgılanan progesteron folliküler fazın sonlarına doğru FSH ve LH'n artışına neden olur. LH artışı oositte mayozun tamamlanmasına, granüloza hücrelerinin lüteinizasyonuna ve follikül çatlaması için gerekli prostaglandinlerin sentezinin başlatılmasına olanak sağlar. Prematür oosit matürasyonu ve lüteinizasyonu lokal faktörler tarafından önlenir. Follikül sıvı içindeki granüloza hücrelerinden kaynaklanan 'oosit matürasyon inhibitörü' (OMİ) LH artışı kadar birinci mayoz bölünmeyi inhibe etmektedir. LH'n başlattığı cAMP aktivitesi OMİ'nin ve lüteinizasyon inhibitörünün (LI) bu lokal inhibe edici aktivitesini yener ve oositte duraklayan birinci mayoz bölünme tamamlanır (Sivashoğlu, 2004). LH artışı ile ortaya çıkan progesteron follikül duvarının gerilebilirliğini artırır. Ovumun kaçıışı

follikül duvarındaki kollojenin dejeneratif değişimleri ile ilişkilidir ve ovulasyondan hemen önce follikül duvarı incelir. FSH, LH ve progesteron proteolitik enzimlerin aktivitesini uyarır ve follikül duvarındaki kollajenin sindirimi gerçekleşir. Gonadotropin artışına cevap olarak granüloza ve teka hücreleri plazminojen aktivatörlerini sentezler. Plazminojen aktivatörleri plazmin üretimi için folliküler sıvıdaki plazminojeni aktive eder (Speroff ve ark., 2005). Plazmin ve diğer proteazlar kolejenaz aktivitesini başlatarak folikül duvarında bağ dokusu degradasyonuna neden olur (Sivaslıoğlu, 2004).

Granüloza hücrelerinde plazminojen aktivatör sentezi sadece preovulatuvar safhada LH'a cevap olarak eksprese edilir. Tekal ve intersitidial hücrelerde oldukça aktif olan inhibitör sistem plazminojenin uygun olmayan aktivasyonunu ve büyüyen follikülün bozulmasını engeller (Speroff ve ark., 2005).

Sonuçta follikül yüzeyinde oluşan stigmanın çatlaması ile oosit ve antral sıvı LH artışının başlangıcından yaklaşık 34-36 saat, LH pikinden de yaklaşık 18-26 saat sonra tubaya doğru atılarak ovulasyon tamamlanır. (Şekil 1.3)



Şekil 1.3 Follikül rüptürü (Speroff ve ark., 2005)

Primordial folliküllerden preovulatuvar follikül gelişerek siklusun 14. gününde ovulasyon meydana gelir. Oosit atılımını takiben follikülün yeni bir organizasyonu (folliküldeki granüloza hücrelerinin proliferasyonu ve yağ dolu lüteal hücrelerin ortaya çıkması) sonucu korpus luteum oluşur (Sivaslıoğlu, 2004).

1.1.3 Luteal Faz

Folikül çatlaması ve oosit salgılanmasından sonra follikülde granüloza hücrelerindeki değişiklik ile lüteinizasyon ve korpus luteum oluşumu ortaya çıkar. Korpus luteum oluşur oluşmaz apoptoza girer. Eğer korpus luteum duvarlarında var olan LH reseptörleri uyarılmazsa atreziye gider, uyarılır ise progesteron salgılanmasına neden olur. Progesteron seviyeleri giderek yükselerek LH artışından yaklaşık 1 hafta sonra en yüksek seviyesine çıkar. Progesteron hem lokal hem de santral etki ile yeni follikül gelişimini suprese eder. Progesteron, östrojen etkisini östrojen reseptörlerinin azaltılması ile antagonize ettiğinden östrojene bağlı folliküler mekanizmalar inhibe olur. Progesteron ve östrojenin her ikisinin de negatif geri besleme etkileri nedeniyle düşük seviyede kalan gonadotropin seviyeleri de luteal fazda yeni folliküllerin gelişiminin başlamasını inhibe eder. Lüteal granüloza hücrelerinden salgılanan ve seviyesi yükselen inhibin; FSH seviyelerinin lüteal dönemde en düşük seviyeye inmesine yol açar. Oluşumundan 10-12 günlük bir süre sonra eğer korpus luteum üzerindeki LH reseptörleri uyarılmaz ise LH reseptörlerini kaybetmeye başlar ve korpus albikansa dönüşerek atreziye uğrar. Bu olaya lüteolizis denir. Eğer oosit fertilize olmuş ise bu dönemde endometriumda blastokist implantasyona başlamıştır ve implante olmuş embriyonun trofoblastik hücrelerinden salınan β -hCG korpus luteumun LH reseptörlerini uyararak progesteron salınımının devamını sağlar (Sivaslıoğlu, 2004).

1.1.4 Menstrual Faz

Mentürasyon reproduktif sistemin tamir ve reorganizasyonun tekrarlandığı luteal dönemden folliküler döneme geçişin olduğu fazdır. Mens başlangıcından 2 gün önce progesteron, östrodiol ve inhibin seviyelerinde azalma FSH seviyelerinde yükselmeye neden olarak gelecek siklus için folliküler gelişim başlatılmış olur. Korpus luteum steroidleri ve inhibin seviyelerindeki azalma ile GnRH-gonadotropin sistemi yeniden aktive olur ve FSH/LH yapımına başlanır. Luteal dönemin 10. gününden sonra lenfositler endometriumu infiltre etmeye başlar ve endometrial stroma içinde lokal granülosit (K hücreleri) proliferasyonu başlar. Stroma progresif

olarak gevşer ve ödemlenir böylece premenstruel desidüal reaksiyonun karakteristik özellikleri oluşur. Steroidlerdeki azalma progesteronun prostaglandin sentezi üzerindeki inhibitör etkisini elemine eder ve lokal prostanoid seviyeleri artar. Endometriumu besleyen spiral arterlerde spasm ortaya çıkar, kapillerlere olan kan akımı bozularak doku iskemik ve nekrotik olur. Doku fragmentasyonu ile fonksiyonel tabaka dökülmeye başlar ki bu olaya mens denilir (Sivaslıoğlu, 2004).

Hücreler birbirleri ile kimyasal sinyaller aracılığı ile haberleşir. Bu sinyal molekülleri hedef hücre yüzeylerindeki spesifik reseptörlere bağlanır. Bağlanmanın ardından sinyal molekülü reseptör proteinini aktive eder, bu olay spesifik ekstrasellüler mesajcı tarafından taşınan sinyalin transdüksiyonunu sağlar. FSH, anterior hipofiz bezi tarafından üretilen önemli sinyallerden biridir. Bu gonadotropin, glikoproteinlerle (FSH, TSH, LH) ilişkili bir ailenin üyesidir. Bu tropik hormonların reseptörleri G-protein çifti reseptör ailesine dahildir. Granüloza ve Sertoli hücreleri FSH'nin hedef hücreleridir. Yumurtalıkta FSH granüloza hücre fonksiyonunu düzenler, ovaryan foliküllerin gelişimini, seçimini, oosit maturasyonunu ve LH ile birlikte ovulatuvar olayları kontrol eder (Ulloa-Aguirre ve Timossi., 1998).

1.2 Follikül Stimüle Edici Hormon Reseptörü

FSHR'ü reproduktif dokularda eksprese edilir ve hipofiz bezinden salınan FSH'a cevap olarak reproduktif aktiviteyi kontrol eder. Kadınlarda FSHR'ü gelişen follikülün granüloza hücrelerinde bulunur ve FSH'a cevap olarak granüloza hücrelerinin bölünmesini arttırır ve folliküler steroid hormonları üretmesi için stimüle eder. FSHR'ü gelişen folliküllerde fazla miktarda bulunurken, atreziye uğrayan follikülerde hızla azalır (Chedrese, 2009).

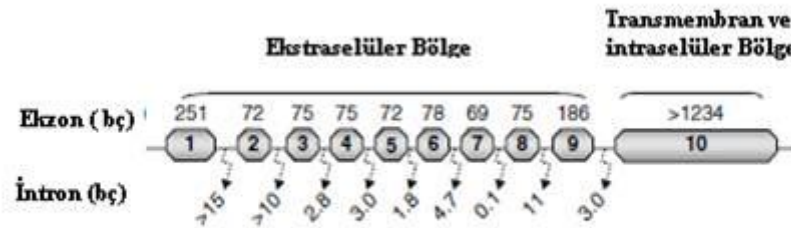
FSH ve LH, insan koryonik gonadotropin (hCG) ve tirotropik hormonu (TSH) da içeren glikoprotein hormon ailesinin üyeleridir (Tapanainen ve ark., 1998).

Bunlar heterodimerik hormonlardır, ortak bir α ve her hormona fonksiyonel spesifiklik kazandıran β alt ünitesi içerirler. Glikoprotein hormonları hedef hücre yüzeyindeki G-protein çifti reseptörleri aracılığı ile görev yapar (Ghadami ve ark., 2008).

1.2.1 FSHR'nün Moleküler Yapısı

FSHR'ü G protein çifti reseptör ailesine dahildir (Lussiana ve ark., 2008). Reseptörlerin protein yapısı; hormon bağlanma afinitesini ve spesifitesini ilgilendiren büyük bir ekstrasellüler bölge, reseptör aktivasyonundan ve sinyal transdüksiyonundan sorumlu bir yedi transmembran bölge ve küçük bir karboksi terminal intrasellüler bölge ile karakterizedir (Ghadami ve ark., 2008). İnsan FSHR proteini 695 aminoasitten meydana gelmektedir. İlk 17 aminoasit hidrofobik sinyal peptidini kodlamaktadır. Bu nedenle olgun protein 678 aminoasitten meydana gelmektedir (Simoni ve ark., 1997; Lussiana ve ark., 2008).

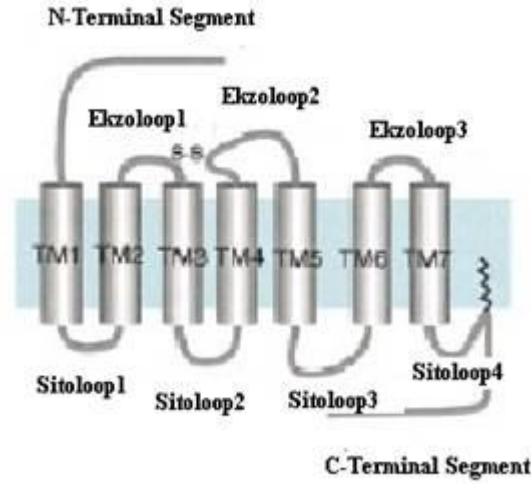
FSH reseptör geni insanda 2p21 kromozom bölgesinde lokalizedir. FSH reseptör geni 10 ekzon ve 9 introndan oluşmaktadır. İnsan reseptörünün ekstrasellüler bölgesi 69-251 bp arasında uzunluğa sahip 9 ekzon tarafından kodlanmaktadır. (Şekil 1.4) Ekstrasellüler bölgenin C-terminal kısmı, transmembran ve intrasellüler bölgeler 10. Ekzon tarafından kodlanmaktadır (Simoni ve ark., 1997; Lussiana ve ark., 2008).



Şekil 1.4 İnsan FSHR geninin yapısal organizasyonu (Ulloa-Aguirre ve ark., 2007)

FSH reseptörü büyük hidrofilik bölgeyi takip eden membranı yedi kez saran bir hidrofobik bölge içerir. Sekansın C terminali ise oldukça bazik sitozolik bir

segmenttir. (Şekil 1.5) Reseptörün ekstrasellüler bölgesi 349 aminoasitten meydana gelmektedir, bu bölgeyi 264 aminoasidin kodladığı transmembran bölge takip etmektedir. Karbosi - terminal intrasellüler bölge ise 65 aminoasit tarafından kodlanmaktadır. (Simoni ve ark,1997)



Şekil 1.5 G protein çifti reseptörü genel yapısı (Ji ve ark, 1998)

Ekstrasellüler Bölge (N-terminal bölge): Glikoprotein hormon reseptörleri büyük ligandlara bağlanmaktadır bu nedenle reseptörler büyük, glikozile ve 1. transmembran bölgeye bağlı bir ekstrasellüler bölgeye sahiptir (Chedrese, 2009). Gonadotropin reseptörlerinin ekstrasellüler NH₂ bölgesinde yüksek afinite ile bağlanma ile ilişkili lösin-zengin tekrarlar (LRR) bulunmaktadır (Ulloa-Aguirre ve ark., 1999). Her bir LRR 20-25 aminoasitten meydana gelmektedir. Bu aminoasitlerin büyük bir kısmı lösin rezidüleridir. Her LRR kısa döngülü bir aminoasit segmenti aracılığı ile bir β -sheet yapısına bağlı α -heliksten meydana gelmektedir (Chedrese, 2009). FSHR'deki lösin zengin tekrarlar spesifik protein-protein interaksyonu için amfipatik peptid yüzeyi oluşturur. Bu bölgenin yapısı ve hormonun β -alt ünitesinin tanınması sırasında gerçekleşen konformasyonel değişim reseptör aktivasyonuna izin verir. (Ulloa-Aguirre ve Timossi., 1998).

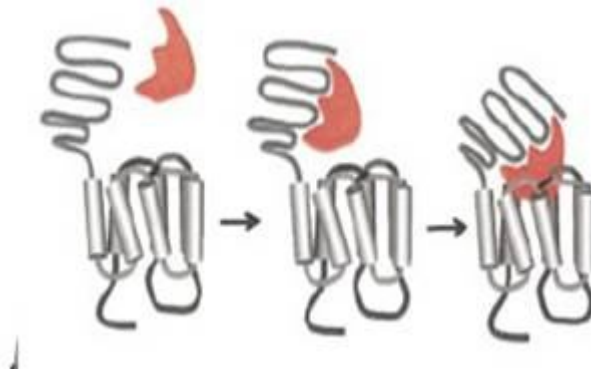
Reseptörün konkav iç yüzeyi 10 LRR'den meydana gelen düzgün “ β -sheet” yapısından oluşmaktadır, ancak “ β -sheet” yapısının N-terminal bölümü (LRR₁₋₇) düz, C-terminal bölümü (LRR₇₋₁₀) ise atnalı şeklinde kıvrımlıdır. FSHR'ü FSH'a konkav iç yüzey aracılığı ile bağlanır. (Şekil 1.6) Reseptörün N-terminal paralel β -kenarları (strand) (LRR₂₋₈) hormon molekülünün merkezdeki kısmı (α -alt ünitesinin C-terminal segmenti ve β -alt ünitesinin ‘seat-belt’ segmenti) ile ilişki kurar. LRR₆'da GpHR'lerin (glikoprotein hormon reseptörü) değişmez asidik rezidüleri olan X₃ ve X₅ pozisyonları (FSHR'nde D150 ve D153) GpH'lerin ortak α -alt ünitesinin bazik K91 ve K51 rezidüleri ile tuz köprüleri oluşturur.



Şekil 1.6 FSHR-FSH kristal yapısının genel görünüşü (Caltabiano ve ark., 2008)

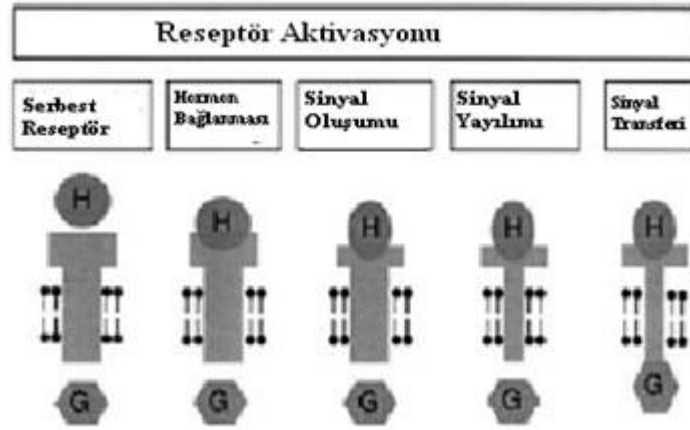
Bu interaksiyonlar tüm GpH'lerde (glikoprotein hormon) korunmuş olduğundan bağlanmanın spesifitesi β -alt ünitesinin ‘seat-belt’ segmenti ile sağlanmaktadır. β -alt ünitesinin ‘determinant loop’ bölgesi korunmuş asidik rezidüleri (FSH'da D93) içermektedir. Bu rezidüleri LRR₄'ün X₅ pozisyonundaki (FSHR'nde K104) polar aminoasit ile interaksiyon verir. Buna göre FSHR ve FSH arasındaki spesifik interaksiyonlar L55 (LRR₂'de X₅) ve E76 (LRR₃'de X₃) ile L99 ve R97 arasındaki hidrofobik ve iyonik interaksiyonlardır. Bunlar hormonun C-terminal loop bölgesinde yer almaktadır. K179 (LRR₇'de X₅) ile ‘determinant loop’taki S89 ve D90 arasında da elektrostatik interaksiyon vardır (Caltabiano ve ark., 2008). FSHR'ün ekstrasellüler bölgesindeki 2'den 9'a kadar olan ekzonlarda en az 10 adet kusurlu (imperfect) LRR motifi bulunmaktadır. Korunmuş pozisyonlar, Ile, Leu, Val,

Ala ve Phe gibi alifatik aminoasitler tarafından tutulmuştur. Amfipatik doğalarından dolayı tekrarlar hem hormon hem de transmembran bölgeler ile interaksyon verirler. (Simoni ve ark., 1997). Glikoprotein hormon reseptörleri N-terminal segment ve membran ilişkili bölgeye sahiptir. N-terminal segment tek başına yüksek afinitede ligand bağlanmasından sorumludur, membran ilişkili bölge ise reseptör aktivasyonunun gerçekleştiği bölgedir. Glikoprotein hormonları ilk olarak N-terminal segmente bağlanırlar. Hormon ve N-terminal segment kompleksi konformasyonel değişime uğrar ve membran ilişkili bölge ile ikincil interaksyonlar verir, böylece sinyal oluşturulur. (Şekil 1.7) Bu ikincil interaksyonlar liganda bağlanmış N-terminal segment ile 'ekzoloop' 1-3 arasında gerçekleşir (Ji ve ark, 1998).



Şekil 1.7 Reseptör hormon interaksyonu (Ji ve ark, 1998)

Hormon bağlanması reseptörü aktive eder. Bu tek aşamalı görünen olay sinyal oluşumu, sinyal propagasyonu (yayılımı) ve sinyal transferini içeren birkaç adımda gerçekleşir. Hormon bağlanması hormon reseptör ara yüzünde konformasyonel değişime neden olur. Buna sinyal oluşumu denir. Reseptördeki konformasyonel değişim sinyali TM bölgesi aracılığı ile reseptörün sitoplazmik bölümüne iletir. Buna sinyal propagasyonu denir (Yi ve ark., 2002). (Şekil 1.8)



Şekil 1.8 Reseptör aktivasyon aşamaları (Yi ve ark., 2002)

İnsan FSHR'nün TM-2 bölümünden uzanan ekzoloop 1'inde lokalize olan bazı amino asit rezidüleri hormon bağlanması (His407) ve reseptör aktivasyonu (Asp405, Thr408 ve Lys409) ile ilişkilidir. Bu bölgeler dışında LH/CG reseptörlerinde hormon bağlanması ve sinyal transdüksiyonu ile ilişkili olan TM-2 (Asp391), TM-6 (Asp564) ile ekzoloop 3 ve TM-7'nin ortak yüzeyinde lokalize olan (Lys591) bölgelerin de glikoprotein hormon reseptörlerinin yapısal ve fonksiyonel benzerliklerinden dolayı FSHR'nün hormon bağlanması ve reseptör aktivasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Ulloa-Aguirre ve Timossi., 1998).

GPCR'ler fonksiyonel protein yapısını stabilize eden disülfid köprüleri oluşturan farklı sayıda Cys rezidülerine sahiptir. Glikoprotein hormon reseptörleri gibi ligand bağlanma bileşenleri ekstrasellüler NH₂-terminali bölümünde olan reseptörlerde korunmuş Cys rezidüleri ekstrasellüler bölgede bulunur ve ligand tanınması ve interaksyonuna izin veren bağlanma cebinin organizasyonuna katkıda bulunur. Bir çok GPCR, N-bağımlı glikozilasyon için (Asn-Xaa-Ser/Thr) konsensus sekansına sahiptir (Ulloa-Aguirre ve ark., 1999).

G-protein çifti reseptörlerinin yaşamı, sentezlendikleri, katlandıkları endoplazmik retikulumda (ER) başlamaktadır. Düzgün olarak katlanmış reseptörler bir araya gelir ve ER-derive COPII- kaplı veziküllere paketlenir. Transport vezikülleri reseptörleri ER'den ER-Golgi ara kompleksine (ERGIC), Golgi aparatına ve trans-Golgi ağına taşır. Bu göç sırasında reseptör olgun hale gelebilmek için glikozilasyon gibi

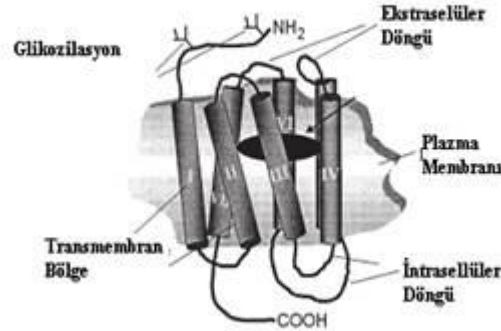
post-translasyonel modifikasyonlara uğrar. Olgun reseptörler daha sonra trans-Golgi ağından plazma membranlarına taşınır. NXS/T konsensus sekansında meydana gelen N-bağlı glikozilasyon GPCR'lerin en yaygın post-translasyonel modifikasyonudur. (Dong ve ark., 2007).

Proteinler ER'de sentezlendikten sonra katlanır ve ER'den dışarıya aktarılacak stabil yapıya sahip olur. ER kalite kontrol sistemi (QCS) özel yapıları tanır ve olgunlaşmamış proteinin hücredeki kaderini belirler. ER kalite kontrol sistemi proteinleri olgunlaşma durumlarına göre tanır ve ayırır. Moleküler şaperonlar yeni sentezlenen proteinlerin katlanma işleminde ER kalite kontrol sisteminin yardımcı komponentleridir. Moleküler şaperonlar yanlış katlanmış olan proteinleri tanır ve degradasyonlarını sağlar. Kalneksin ve kalretikulin FSHR'ne bağlanan moleküler şaperonlardır. Bu şaperonlar etkilerini yeni sentezlenen proteinin üzerinde bulunan ve katlanmış proteine hidrofobiklik kazandıran N-glikanlar üzerinden gösterir (Conn ve ark., 2007). FSHR'nün N-bağlı glikozilasyonu reseptörün hücre-yüzey ekspresyonu için gereklidir, glikozilasyon bölgesinde meydana gelen bir mutasyon reseptörün plazma membranına taşınmasını engeller böylece mutasyona uğramış reseptör perinükleer bölgede birikir (Dong ve ark., 2007).

FSHR'nün ekstrasellüler bölgesinde N-bağımlı glikozilasyon için 191, 199 ve 293. pozisyonlarda her türde korunmuş 3 önemli bölge bulunmaktadır (Simoni ve ark., 1997). FSHR'nün glikozilasyonu reseptör protein katlanması, ve membrana gönderilmesi için gereklidir (Lussiana ve ark., 2008).

Transmembran Bölge: Heptahelikal veya serpetin transmembran bölge yapısal motifi G-protein çifti reseptör süper ailesi üyeleri için tipiktir. Bu grubun her bir üyesinde motif, transmembran α heliks oluşturmak üzere 20-25 aminoasitlik yedi hidrofobik gerilim bölgesi (stretches) ile karakterizedir, bunlar alternatif ekstrasellüler ve intraselüler ilmek (loop) tarafından bağlanmaktadır. FSH reseptörü birinci ve ikinci ekstrasellüler döngüde molekül içinde disülfid köprüleri oluşturmak için yüksek oranda korunmuş iki tane Cys (sistein) rezidüsü içermektedir ve bunlar protein konformasyonunu sıkı şekilde tutmaktadır. Yüksek oranda korunmuş

Asp-Arg-Tyr triplet motifinin reseptör ve G protein arasındaki interaksyonda rol oynadığı düşünülmektedir (Simoni ve ark,1997; Lussiana ve ark., 2008). FSHR’ünde Asp yerine Glu bulunmaktadır, bu substitüsyon LH ve TSH reseptörlerinde de görülmektedir (Simoni ve ark,1997). Yedi transmembran bölge (TM), bir ekstrasellüler NH₂, bir intrasellüler COOH-terminali ve üç ekstrasellüler ve intrasellüler bağlama bölgesi içeren fıçı şeklinde ligand bağlanması ile ilgili bir yapıdır. Transmembran bölgeler hidrofobikliğe göre de çeşitlilik gösterir. I, IV ve VII TM’ler sadece bir hidrofilik rezidüye sahiptir ve II, III, V ve VI. TM’lerden daha hidrofobiktirler. Bu ailenin üyeleri arasında yüksek oranda korunmuş olan rezidüler reseptör yapı ve fonksiyonu için gerekli yapısal bileşenleridir. Örneğin rhodopsin/ b-adrenergik ailesi reseptörlerinde TM-II Asp ve TM-I ve VII’deki Asn rezidüleri yüksek oranda korunmuştur. Bu rezidülerin lokasyonu ve aralarındaki etkileşim 2. ve 7. helikslerin bir arada durması için gereklidir ve reseptör aktivasyonuna ve sinyal transdüksiyonuna izin vermektedir. Aynı TM bölgesinde veya TM bölgeleri arasında hidrojen bağları da bulunmaktadır. Bu TM bağları ya da köprüleri TM korunun sıkı halde bulunması için önemlidir (Ulloa-Aguirre ve ark., 1999). (Şekil1.9)



Şekil 1.9 GPCR Transmembran bölge (Ulloa-Aguirre ve ark., 1999)

C-Terminal Bölge: C-terminal intrasellüler bölge 65 aminoasitten oluşmaktadır. Bu bölge fosforilasyon bölgeleri olan Ser ve Thr rezidüsü bakımından zengindir. Bu bölgeler spesifik intrasellüler kinazlar ile fosforile olduğunda FSH/FSHR bağlanmasından kaynaklanan sinyal transdüksiyonunu düzenlemektedir (Lussiana ve ark., 2008). Transmembran bölgede disülfid bağı oluşturan spesifik Cys rezidüleri

tanımlanmamıştır, ancak COOH-terminalin membran proksimal bölümündeki Cys rezidülerinin palmitolasyona uğradığından önemli olabileceği düşünülmektedir. Bu bölgedeki palmitolasyon dördüncü bir intrasellüler loop oluşturur ve membran çapası (anchor) oluşumuna izin verir. Reseptör palmitolasyonunun fizyolojik önemi tam olarak anlaşılamamış olsa da b-adrenergik reseptörlerinde palmitolasyonunu engelleyen mutasyonların G protein aktivasyon kaybına ve reseptör ayrılmasına (*uncoupling*) neden olduğu gösterilmiştir (Ulloa-Aguirre ve ark.,1999). G protein-bağlı reseptörlerde intrasellüler COOH-terminal bölgesi fosforilasyon bölgeleri olan Ser ve Thr rezidülerince zengindir. Spesifik agonistlerine bağlandıklarında b-adrenergik ailesi reseptörleri stimulatuar G proteini (G_s) aktive eder, bu olay sonucunda da efektör olan adenilil siklaz aktive olur. Enzim ekstrasellüler sinyallerin hücre içi araçlarından biri olan adenosin 3',5'-monofosfat (cAMP) oluşumundan sorumludur (Ulloa-Aguirre ve ark., 1999).

1.2.2 FSH Reseptör Geninin Promotoru

FSHR gen ekspresyonu doku spesifiktir ve farklı hormonal uyaranlara bağlıdır. İnsanda ana transkripsiyon başlama bölgesi -99. pozisyonda, translasyon başlama bölgesine yakın olarak bulunmaktadır. Bütün türlerde fazladan, alternatif olan ya da daha az kullanılan transkripsiyon başlama bölgeleri bulunmaktadır. İnsan FSHR mRNA'sı testis ve yumurtalıkta aynıdır. Gen ekspresyonunun cinsiyet spesifik ekspresyonu farklı transkripsiyon başlama bölgelerinin kullanımından kaynaklanmaktadır (Simoni, 1997).

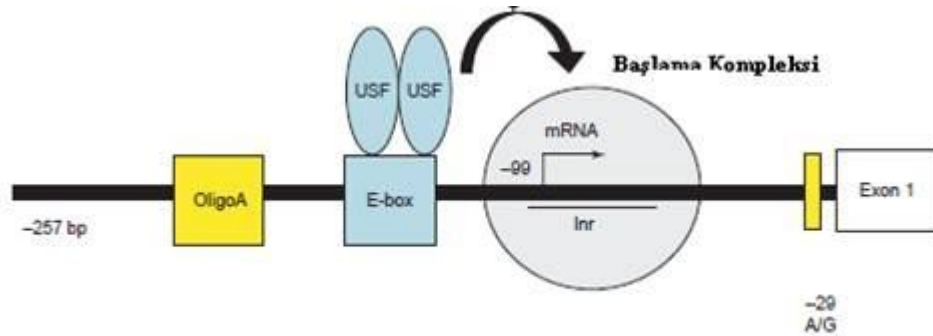
FSHR promotoru TATA ve CCAAT kutusu olmayan promotor grubuna dahildir ve bir kaç transkripsiyonel başlama bölgesi bulunmaktadır (Simoni, 1997; Simoni ve ark., 2002; Gromoll ve Simoni, 2005).

FSHR gen yapısının aksine insan FSHR gen promotor bölgesi ile ilgili bilgiler sınırlıdır. İnsan FSHR promotor bölgesi ile ilgili çalışmalar -184, -114, -99, -83 ve -79'da beş adet transkripsiyonel başlama bölgesi olduğunu ve -99'un ana

transkripsiyon başlama bölgesi olduğunu ortaya koymuştur. Rat, fare ve koyun FSHR genlerinin kor promotor bölgesinde yapılan çalışmalarda, E- kutusu elementi, AP-1 bölgesi, InR elementi, E2F elementi, GATA bölgeleri, CACC kutusu ve iki steroidogenik factor-1 (SF-1)-benzeri bağlanma bölgesi (SLBS) gibi önemli regülatör bölgeleri tanımlanmıştır ancak E- kutusu dışında bu bölgeler insan FSHR geninde tanımlanmamıştır (Wunsch ve ark., 2005).

Hücre spesifitesi göstermeyen ve en yüksek transkripsiyonel aktivite gösteren insan FSHR'nün kor promotor bölgesi -225 ve -1 bölgeleri arasında bulunmaktadır ve translasyon bölgesine yakındır. Bugüne kadar kor promotor bölgesinde iki cevap elementi tanımlanmıştır. Bir E-kutusu konsensus sekansı (CACATG) , USF gibi bazik *helix-loop-helix* transkripsiyonel faktörlerinin bir ailesi ile interaksiyon verir, bu interaksiyon tüm promotor aktivitesi için gereklidir. İkinci element ise transkripsiyonel başlama bölgesini saran initiatör (Inr) elementidir ve housekeeping genler için tipiktir (Gromoll ve Simoni, 2005). (Şekil 1.10)

FSHR'ü gibi TATA motifinden yoksun genlerde transkripsiyon farklı bölgelerden başlar ve Inr elementleri RNA polimeraz II'nin uygun konuma gelmesine yardımcı olur (Heckert ve Griswold, 2002).



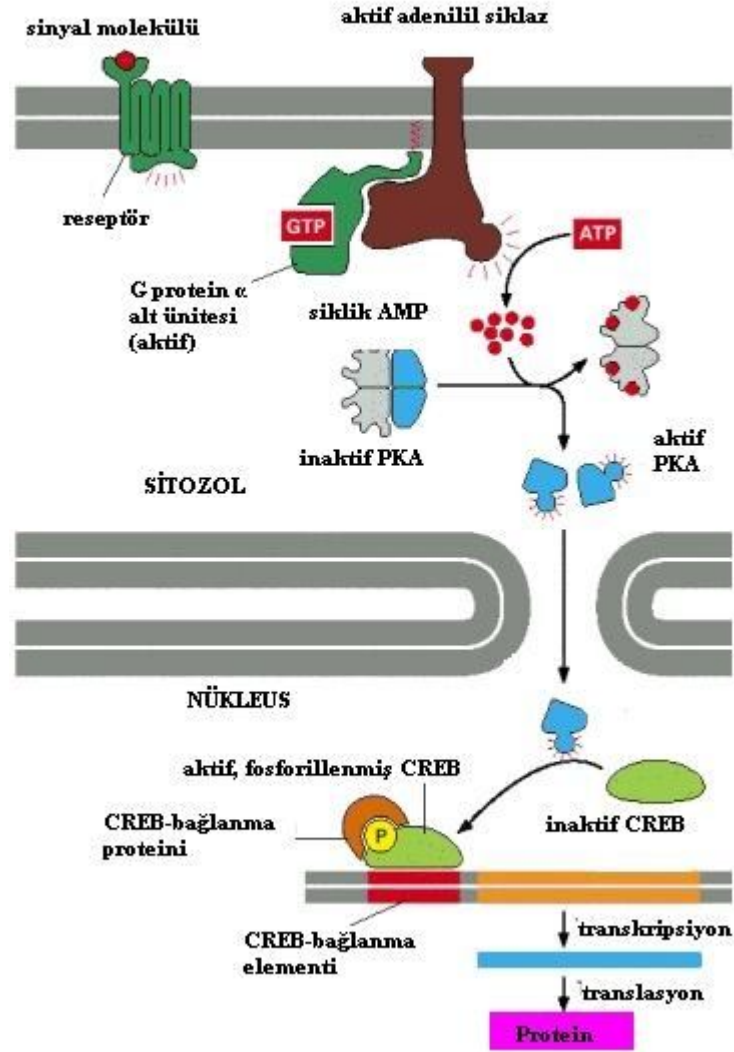
Şekil 1.10 FSHR gen promotor bölgesi (Gromoll ve simoni, 2005)

Birçok sinyal kaskadı içsel ve dışsal sinyalleri hücre içi cevaplara dönüştürmek için G protein çifti reseptörlerini (GPCR) kullanmaktadır. GPCR'ler karakteristik olarak reseptörden enzim ve iyon kanalları gibi hücresel efektörlere iletilen mesajı taşıyan G-proteinlerinin (*guanine-nucleotide-binding signal transducing proteins*) bir veya daha fazla üyesini uyarmaktadır. Bu efektörler hücre büyümesi ve farklılaşması gibi hücresel olayların büyük bir kısmını düzenleyen ikincil mesajcıların seviyesini etkiler (Ulloa-Aguirre ve ark., 1999).

FSHR insan granüloza hücrelerinin plazma membranında bulunur, FSH'a bağlandıktan sonra bir cAMP bağımlı negatif geri bildirim döngüsü, hücre yüzeyinde reseptör ekspresyonunun '*down-regülasyon*'una neden olur. FSHR proteini granüloza hücrelerinde sentezlenir, glikozillenir daha sonra hücre yüzeyine gönderilir. FSH'a bağlanma ve sinyal transdüksiyonu reseptörün farklı özellikleridir. Hormona bağlandıktan sonra, FSHR bir G protein ile interaksiyon verir, ko-faktör guanosil trifosfata (GTP) bağlanır ve adenilil siklaz enzimini ikincil mesajcı olan siklik AMP (cAMP) sentezlemesi için uyarır. Granüloza veya Sertoli hücrelerinde artan cAMP FSHR'nün aktivitesini belirlemek için kullanılabilir. Bundan sonra yapısal proteinleri, enzimleri ve transkripsiyon modülatörlerini fosforilleyecek olan protein kinaz A (PKA) aktive edilir. cAMP cevap elementleri ailesi (CRE), bağlanma proteinleri (CREB) FSH sinyalinin ikincil efektörleri olarak önemlidir. Granüloza hücrelerinde, FSH intraselüler Ca^{+2} seviyesini arttırır, bu durum cAMP etkisini arttırır (Lussiana ve ark., 2008).

cAMP, FSH, LH, koryonik gonadotropin (hCG), tiroidi stimüle edici hormon (TSH) için hücre içi mesajcıdır. Tropik hormonun hücre membran reseptörü ile birleşmesi membran duvarındaki adenilat siklaz enzimini aktive eder ve hücre içindeki adenosin 5'-trifosfatın (ATP) siklik AMP (cAMP)'ye çevrimine neden olur. Uyarının spesifitesi, hücre duvarındaki reseptörün yapısı ve fonksiyonundaki değişiklikler ile değişebilmektedir. Salınan cAMP spesifik olarak sitoplazma reseptör proteinine bağlanır ve cAMP reseptör protein kompleksi protein kinazı aktive eder. Protein kinaz, 2 düzenleyici alt ünite ve 2 katalitik alt ünite içerir ve inaktif formda bulunur. cAMP'nin düzenleyici alt ünitelere bağlanması ile katalitik

üniteleri salınır ve düzenleyici alt üniteler dimer halinde kalır. Katalitik alt üniteler, enzimler, mitokondriyal ve kromatin proteinleri gibi hücrel proteinlerin fosforilasyonunu katalizler. Fizyolojik olaylar bu cAMP-aracılı enerji üretim olaylarını takip eder. cAMP daha sonra fosfodiesteraz enzimi tarafından inaktif olan 5'-AMP'ye degrade edilir.



Şekil 1.11 cAMP sistemi (Alberts ve ark., 2002)

DNA katalitik alt üniteler tarafından fosforillenmiş proteinlere bağlanan ve gen transkripsiyonunun aktivasyonu ile sonuçlanan cevap elementlerini içermektedir. cAMP cevap elementi (CRE) transkripsiyonun başlama bölgesinin yukarı bölgesi (upstreaminde) güçlendirici olarak görev yapar. Transkripsiyon faktörlerinin büyük bir ailesi CRE ile interaksiyon vererek gen transkripsiyonu için önemli bir

düzenleyici ünite oluşturur. cAMP, siklik AMP düzenleyici protein bağlanma proteini (CREB) olan spesifik bir transkripsiyon faktörünü aktive eder. CREB'in CRE' ye bağlanması bir çok genin transkripsiyonunu aktiveleştirir (Speroff ve ark., 2005). (Şekil 1.11)

Kadın ve erkek üreme sisteminin temelini hipotalamus-hipofiz-gonodal aks oluşturur. Bu sistemin bozulması gonadların patofizyolojisini bozarak infertiliteye ve bazı durumlarda malignansilere neden olabilir (Strauss ve Barbieri, 2006).

1.2.3 FSHR Genetik Varyasyonu ve İnfertilite

FSHR' de 731 tek nukleotid polimorfizmi (TNP) bulunmaktadır. Bunların sadece 5 tanesi kodlayan bölgede (ekzon), diğerleri intronlarda bulunmaktadır. TNP'lerden bir tanesi FSHR mRNA'sının 29. pozisyonunda 5' translasyon olmayan bölgede bulunur. Kodlayan bölgedeki 5 TNP (307, 329, 524, 665, 680) ekzon 10'da bulunur. Bunlardan 4'ü non sinonimdir. Ala307Thr (G919A) ve Ser680Asn (G2039A) polimorfizmlerinin frekansı ve etnik dağılımları iyi tanımlanmış olmasına karşın Ala665Thr, Arg524Ser ve Thr329Thr polimorfizmlerinin prevalansı hakkında bilgi bulunmamaktadır (Gromoll ve Simoni, 2005).

-29. pozisyonundaki TNP, c-E- *twenty-six* (c-ETS) transkripsiyon faktörü için bağlanma bölgesi sunan, GG/AAA konsensus sekansında bulunmaktadır (Gromoll ve Simoni, 2005).

Yapılan çalışmaların bir tanesinde -29 A/A homozigot olan hastalarda FSH seviyesinin diğer hastalara göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (Wunsch ve ark., 2005).

Yapılan başka bir çalışmada -29. pozisyonundaki TNP'in FSH reseptör geninin transkripsiyonel aktivitesi ile ilgili olduğu ve AA genotipinin tedaviye zayıf cevap verme ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Achrekar ve ark., 2009).

2010 yılında yapılan bir çalışmada -29 AA genotipinin kontrollerle karşılaştırıldığında primer ve sekonder amenoreli bireylerde görülme sıklığı daha yüksek bulunmuştur, ayrıca primer amenoreli hastaların serum FSH seviyelerinin -29.pozisyonunda AA genotipine sahip bireylerde daha yüksek olduğu bulunmuştur (Achrekar ve ark., 2010).

FSH reseptörünün kodlayan bölgesinde yapılan mutasyonel araştırmada ekzon 10'da 307. ve 680. pozisyonlarda 2 yaygın polimorfizm olduğu gösterilmiştir. Çalışmalar ekzon 10'daki polimorfizmlerin reseptör proteinini ve üreme tedavisi alan kadınlarda yumurtalığın FSH indüksiyonuna duyarlılığını etkilediğini ortaya koymuştur (Wunsch ve ark., 2005).

307. ve 680. aminoasitleri kodlayan kodonlar bağlantı eşitsizliği (*linkage disequilibrium*) gösterirler, çünkü rekombinasyon sırasında birbirlerine bağlanır ve rastgele dağılım göstermezler. Bu durum bu pozisyonlarda farklı allelik varyantlar oluşturur. Bu varyantlardan farklı etnik gruplarda en sık görülenler Ala307/Ser680 ve Thr307/Asn680'dir (Lussiana ve ark., 2008). Ala307-Ser680 dünya genelinde % 40 oranında görülmektedir (Wunsch ve ark., 2007).

Farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalar 680. pozisyonundaki Ser/Ser varyantına sahip bireylerin bazal FSH seviyesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Sudo ve ark., 2002; Falconer ve ark., 2005; Grebb ve ark., 2005; Simoni ve ark., 2008).

FSH reseptörünün, -29A-A919A-A2039A, -29G- A919A-A2039A, -29A-G919G-G2039G ve -29G- G919G-G2039G olarak 4 yaygın kombinasyonu bulunmaktadır (Gromoll ve Simoni, 2005).

FSHR gen sekansında bulunan mutasyonlar FSHR protein yapısındaki aminoasitlerde önemli değişikliklere yol açabilir. FSHR gen mutasyonları hücre yüzeyinde reseptör ekspresyonu, FSH bağlanma kabiliyeti ve FSH sinyal transdüksiyonu ile ilişkili olabilir (Lussiana ve ark., 2008).

Aittomaki ve arkadaşları 1995 yılında FSHR geninin 7. ekzonunda, dirençli yumurtalık sendromundan (*Resistant ovarian syndrome*) kaynaklanan yumurtalık yetmezliğine neden olan bir mutasyon tanımlamıştır. Etkilenmiş kadınlar infertildir ve günümüzde infertilitede hormon tedavisinden başka bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (Ghadami ve ark., 2008).

FSHR'nin inaktive edici mutasyonu, proteinin ekstraselüler ligand bağlanma bölgesinde bulunmuştur. Ekzon 7'de bir C566T transisyonu 189. rezidüde Ala'nin yerine Val'in geçmesine neden olur (Tapanainen, 1998).

Ala189Val mutasyonuna sahip kadınların fenotipi, FSHR'nün kısmen inaktif formlarını eksprese eden kadınlardan daha ciddidir (Ranniko ve ark., 2002).

FSHR genindeki Ala189Val mutasyonu homozigot olduğunda kadınlarda folliküler olgunlaşmanın durmasıyla hipergonadotropik ovaryan yetmezliğine ve erkeklerde spermatogenezin bloke edilmesine neden olur. Val 189 bakımından homozigot olan kadınlarda folliküler olgunlaşma bloke olur ve granüloza hücreleri apoptoza gider. Ayrıca granüloza hücrelerinin aromataz içeriği ihmal edilebilir ve intrafolliküler çevrede de östrojen seviyesi düşüktür. Bu durum follikülün erken atreziye gitmesine neden olur. Bu durumda yumurtalık steroid üretiminde ekzojen olarak FSH verilmesinin bir etkisi yoktur ve hCG serum östrojen konsantrasyonunu arttıramaz. Mutasyon heterozigot olduğunda iyi korunmuş yumurtalık hacmi ile birlikte sekonder amenoreye neden olur, bu da FSHR aktivitesinin büyük ölçüde azaldığını ancak follikül havuzunun iyi korunduğunu göstermektedir (Lussiana ve ark, 2008).

Mutasyon maymun, koyun ve rat FSHR'leri ile karşılaştırıldığında oldukça korunmuş bir bölgede bulunmaktadır. Bu da bölgenin fonksiyonel önemini göstermektedir. Bu bölge FSHR, LHR ve TSHR'de aynı olan beş aminoasitlik bir sekansa dahildir ve konsensus N-bağlı glikolizasyon bölgesi içermektedir. Bölgenin üç glikoprotein hormon reseptöründe de yüksek oranda korunmuş olması ligand spesifik tanıma ve bağlanma bölgesi olmadığını göstermektedir.

Bu bölge daha çok reseptörün plazma membranına taşınmasında rol oynamaktadır (Tapanainen, 1998).

Ala 189, glikoprotein hormon reseptörlerinde iyi korunmuş 5 aminoasitlik bölgenin (Ala189PheAsnGlyThr) ilk aminoasitidir. 189. pozisyonunda Val bulunması glikolizasyonun etkinliğini düşürür ve sonuçta hasarlı reseptör gidiş gelişine (*trafficking*) ve protein katlanmasına neden olur (Themmen ve Huhtainen, 2000).

Mutant genle transfekte edilmiş MSC-1 hücrelerinin artan FSH ile inkübasyonundan sonra cAMP üretiminin wt FSHR ile tranfekte edilen hücrelerden daha düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca FSH'ın stimüle ettiği IP3 konsantrasyonu da mutant FSHR'ye sahip hücrelerde düşük seviyede bulunmuştur. Mutant reseptörün FSH bağlanma kinetiği normaldir çünkü Ala 189 Val mutasyonu FSH-FSHR interaksiyonunu etkileyen bir bölgede bulunmamaktadır ve hormon reseptör kompleks oluşumuna zarar vermez. Ala189Val mutasyonu FSHR'nin konformasyonel değişim aracılığı ile FSH bağlanmasından sonra sinyal transdüksiyonunu etkiler. Mutasyon FSHR'nin hücre membran hedeflenmesini ve reseptörün ikincil mesajcı sentezini etkiler (Lussiana ve ark, 2008).

Mutant Ala 189 Val varyant kurucu etkisinden dolayı kuzey doğu Avrupa'da nadir değildir (Lussiana ve ark, 2008).

C566T (Ala189Val) inaktive edici mutasyonu Brezilya ve Japon populasyonlarında yapılan çalışmalarda görülmemiştir. Yunan populasyonunda 33 prematür over yetmezlik tanısı (POF) almış kadın, ovulasyon indüksiyonuna zayıf yanıt veren 8 kadın ve 20 kontrolle yapılan çalışmada hastaların ve kontrollerin hiç birinde homozigot veya heterozigot mutasyon saptanmamıştır (Loutradis ve ark, 2006).

Finlandiya, İsviçre, Danimarka ve Singapur'un Çin populasyonlarında yapılan çalışmada Finlandiya'da C566T mutasyonunun görülme frekansı %0,96 iken,

İsviçre’de sadece 1 tane mutasyon taşıyıcısı saptanmış, diğer iki popülasyonda ise mutasyon saptanmamıştır (Jiang ve ark, 1998).

189. pozisyonda Val bulunması glikozilasyonun etkinliğini düşürür ve sonuçta hasarlı reseptör trafiğine (reseptörün plazma membranına taşınamaması) ve yanlış protein katlanmasına neden olur (Themmen ve Huhtainen, 2000). Bu mutasyonun homozigot olduğu durumlarda kadınlarda foliküler olgunlaşmanın durmasıyla hipergonadotropik ovaryan yetmezlik meydana gelirken, erkeklerde spermatogenezin bloke edildiği gösterilmiştir (Lussiana ve ark., 2008).

Çalışmalar spermatogenetik bozukluklarda, FSHR geninin üç bölgeyi kapsayan tek nükleotid polimorfizmlerinin (-29. pozisyon ile ekzon 10’daki 307 ve 680. pozisyonundaki polimorfizmler) birçok genetik faktörden biri olabileceğini göstermektedir ancak bu üç tek nükleotid polimorfizminin yumurtalık fonksiyonu üzerine birlikte olan etkisi araştırılmamıştır.

Bu tez çalışmasında kadınlarda normal üreme fonksiyonu için gerekli olan FSH hormonunun reseptör geninde meydana gelen G919A (Ala307Thr), G2039A (Ser680Asn) , G29A tek nükleotid değişimlerinin ve C566T (Ala189Val) inaktive edici mutasyonunun kadın fertilitesi ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma kapsamında 50 primer infertil kadın hasta ve 50 sağlıklı fertil kadın olmak üzere 100 örnek incelendi.

Çalışmaya Ankara Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan, Üreme Sağlığı, Teşhis, Tedavi, Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (ÜSAUM)'dan infertilite teşhisi almış 50 kadın hasta ve Ankara Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Üreme Sağlığı, Teşhis, Tedavi, Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezine (ÜSAUM) başvuran sağlıklı birbirleri ile akraba olmayan, her hangi bir hastalığı olmadığı bilinen ve ilki istemelerini takiben 1 yıl içerisinde olmak üzere doğal yolla en az 1 çocuk sahibi olduğu tespit edilen 50 gönüllü sağlıklı kadın fertil kontrol birey katıldı. İnfertilite tanısı; çiftlerin 1 yıldan fazla süreyle çocuk sahibi olmayı istemeleri, düzenli bir cinsel yaşama sahip olmalarına rağmen bunu başaramadıkları durumda konuldu. Erkeklerin yapılan muayenelerinde sperm parametreleri 20 milyon/ml'nin üzerinde, motilitesi $a > \%25$ veya $a+b > \%50$ ve normal morfoloji $\% 4-14$ olan, eşlerden erkeğe ait bir neden saptanmayan kadın hastalar çalışmaya dahil edildi. Kadın hastaların infertiliteye neden olabilecek düzeltilebilir hastalıkları (endometriozis, tubal tıkanıklık, yapışıklık) bulunmadığına dikkat edildi. 2-5. günlerdeki bazal hormon değerleri kadın doğum uzmanı tarafından değerlendirildi.

Çalışmamıza katılan bireylerden kan örnekleri alınmadan önce çalışmanın amacı ve yöntemi hakkında bilgi verildi. Gönüllü katılımcı olmaları halinde, kendi iradeleriyle bu çalışmaya katıldıklarını gösteren bir bilgilendirilmiş onam formu imzalatıldı (Ek- 1, Ek-2).

2.2. Polimorfik Özelliklerin Belirlenmesi

2.2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Solüsyonlar

2.2.1.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Periferik kandan DNA izolasyonu için kullanılan reaktif maddeler çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Periferik kandan DNA izolasyonu için kullanılan reaktif maddeler.

Lizis tampon (pH:8,2)	Tris-HCl (Sigma)	10mM
	NaCl (Merck)	400mM
	Na ₂ EDTA(Merck)	2mM
%10 SDS	Sodyum Dodesil Sülfat (Merck)	10gr/100ml
Proteinaz K	(Amresco)	100mg/ml
Sature Amonyum Asetat	(Merck)	9M
Tris-EDTA tampon (TE) (pH=7,5)	Tris-HCl	10mM
	Na ₂ EDTA	2mM

2.2.1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile DNA amplifikasyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılan reaktif maddeler çizelge 2.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılan reaktif maddeler

Taq DNA polimeraz tampon (10X) (Fermentas)	10mM KCl, 10mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20mM Tris-HCl, 2mM MgSO ₄ , %0,1 Triton X-100, pH 8,8.
MgCl ₂ (Fermentas)	25mM
Taq DNA polimeraz (Vivantis)	5U/μl
dNTP karışımı (Vivantis)	10mM
10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH:7,5)	

2.2.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda kullanılan primer diziler

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler çizelge 2.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler

Mutasyon/ Polimorfizm	Primer Dizisi		Primer Dizisi
-29. Bölge	F	ATCCCTTGGTGGGTCACAT	418
	R	ATTCAGGACTTCGGTCAA	
Ser 680Asn	F	TTTGTGGTCATCTGTGGCTGC	520
	R	CAAAGGCAAGACTGAATTATCATT	
Ala 307Thr	F	CAAATCTATTTTAAGGCAAGAAGTTGATTATATGACTCAG	364
	R	GTAGATTCCAATGCAGAGATCA	
Ala189Val	F	GGCCTTTTATTTTCAGATGGCTG	114
	R	TGGCCTTGAAGAATAGTCAGG	

2.2.1.4. Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmlerinde kullanılan enzimler

-29. Bölge için Mbo II Restriksiyon enzimi (Fermentas)

Ser680Asn için Bse1I Restriksiyon enzimi (Fermentas)

Ala307Thr için Bse21I Restriksiyon enzimi (Fermentas)

Ala189Val için PctI Restriksiyon enzimi (Fermentas)

2.2.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Applichem, standart)

Tris-Borik Asit EDTA tampon (TBE) : Tris baz (Ambresco)

(pH:7,5) Borik asit (Ambresco)

Na₂EDTA (Merck)

Yükleme Tamponu	: 1XTBE tampon 100ml Gliserol (Merck) Fenol Blue (Mavi)
Etidyum Bromür	: 10mg/ml
Moleküler Ağırlık Belirleyicisi	: Fluorescent 50 bp DNA Ladder 50bp-500bp (Jena Bioscience) 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200,150,100, 50 baz çifti.

2.2.2. DNA İzolasyonu ve Kantitasyonu

Çalışmamıza katılan gönüllü bireylerden alınan 5ml periferik kandan DNA izole edildi. DNA izolasyonu aşağıda belirtilen standart fenol-kloroform yöntemiyle yapıldı (Sambrook ve ark.,1982).

- 2×10^6 hücre 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 2 kez PBS ile yıkandı.
- 300µl lizis solüsyonu (5mM EDTA, 10mM Tris-HCl , pH=8,0, 100mM NaCl, %0,5 SDS (Sodium dodecyl sulfate), 0,5 mg/ml Proteinaz-K) ile yeniden süspanse edildi.
- Vortekslenen karışım bir gece 37°C 'de etüvde inkübe edildi.
- Ertesi gün solüsyon üzerine eşit hacimde doymuş fenol eklenip karıştırıldıktan sonra 1500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant temiz bir tüpe alınıp üzerine eşit hacimde kloroform:izoamil alkol karışımı (24:1) eklendi ve karıştırıldı.
- 1500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı.
- Solüsyon üzerine eşit hacimde saf etanol ilave edildi ve yavaşça karıştırılarak DNA'nın presipite olması beklendi. Presipite olan DNA mikropipet ile 1.5 ml'lik mikrofüj tüpüne aktarıldı.
- Bir kez saf etanol, bir kez de %70 etanol ile 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi, süpernatant atılır ve DNA kurumaya bırakıldı.

- Kurutulan DNA, 10mM Tris pH=7,5, 1 mM EDTA eklenerek yeniden süspanse edildi.
- Elde edilen DNA' nın miktar ve saflığının saptanabilmesi için spektrofotometrik ölçüm aşağıdaki gibi yapıldı.
- Çözülmüş DNA örneğinden 20 µl alınıp quartz tüp içinde dH₂O ile hacmi 2 ml'ye tamamlandı, iyice karıştırıldı.
- Spektrofotometrede OD260 ve OD280 değerleri ölçülür. OD260 ve OD280 değerlerinin oranı hesaplanarak DNA' nın saflığı belirlendi. 260:280 oranı DNA' nın saflığının hesaplanmasında alınan temel kriterdir.
- Aşağıdaki formül kullanılarak elde edilen DNA' nın konsantrasyonu belirlendi.
Konsantrasyon (µg/µl) = OD260 x 0.05 x 100 (sulandırma katsayısı)

2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

FSH hormonunun reseptörünün A919G (Thr307Ala), G2039A (Ser680Asn), G29A ve C566T (Ala189Val) allellerinin tespiti için, ilgili gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonuyla çoğaltıldı. Bu işlem için öngörülen primer dizileri yukarıda belirtilmiştir. Bu polimorfik varyantlar için oluşturulan PCR şartları çizelge 2.4, çizelge 2.5, çizelge 2.6 ve çizelge 2.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. G29A aleli için PCR şartları

Reaksiyon karışımı	G29A	Reaksiyon Döngüsü; 1-95°C 10' denatürasyon 2-94°C 45" 3-57°C 45" 4-72°C 1' 5-72°C 5' 2. ve 4. değerler arasında 39 döngü
Genomik DNA	100 ng	
Primerler(10pmol/µl)	0,5µl	
dNTP(2,5mM)	2,5µl	
MgCl ₂ (25mM)	3µl	
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0,2 µl	
Tampon(-MgCl ₂ ,10X)	2,5µl	
Toplam Hacim	25 µl	

Çizelge 2.5. Ala307Thr aleli için PCR şartları

Reaksiyon karışımı	Ala 307 Thr	Reaksiyon Döngüsü;
Genomik DNA	100 ng	1-95°C 8' denatürasyon
Primerler(10pmol/μl)	0,5μl	2-94°C 45"
dNTP(2,5mM)	2,5μl	3-53°C 45"
MgCl ₂ (25mM)	3μl	4-72°C 1'
Taq DNA polimeraz (5U/ μl)	0,3 μl	5-72°C 10'
Tampon(-MgCl ₂ ,10X)	4μl	2. ve 4. değerler arasında 39 döngü
Toplam Hacim	50 μ	

Çizelge 2.6. Ser680Asn alelleri için PCR şartları

Reaksiyon karışımı	Ser 680 Asn	Reaksiyon Döngüsü;
Genomik DNA	100 ng	1-95°C 10' denatürasyon
Primerler(10pmol/μl)	1μl	2-94°C 1'
dNTP(2,5mM)	2μl	3-61°C 1'
MgCl ₂ (25mM)	3μl	4-72°C 1'
Taq DNA polimeraz (5U/ μl)	0,3 μl	5-72°C 10'
Tampon(-MgCl ₂ ,10X)	4μl	2. ve 4. değerler arasında 37 döngü
Toplam Hacim	50 μl	

Çizelge 2.7. Ala189Val alelleri için PCR şartları

Reaksiyon karışımı	Ala189Val	
Genomik DNA	100 ng	Reaksiyon Döngüsü; 1-95°C 5' denatürasyon 2-94°C 1' 3-62°C 1' 4-72°C 45" 5-72°C 10' 2. ve 4. değerler arasında 37 döngü
Primerler(10pmol/μl)	0,5μl	
dNTP(2,5mM)	2,5μl	
MgCl ₂ (25mM)	2μl	
Taq DNA polimeraz (5U/ μl)	0,2 μl	
Tampon(-MgCl ₂ ,10X)	2,5μl	
Toplam Hacim	25 μl	

2.2.4. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin polimorfik varyant taşıyıcılığı “Restriksiyon Enzimleri Uzunluk Polimorfizmleri” yöntemi kullanılarak araştırıldı. G29A aleli araştırmasında kullanılan Mbo II enzimi ile PCR ürünüde mutant alel var ise enzim kesimi gerçekleşmemektedir. Ala307Thr aleli araştırmasında kullanılan Bse21I enzimi ile PCR ürünüde mutant alel yok ise enzim kesimi gerçekleşmektedir. Ser680Asn araştırmasında kullanılan Bse1I enzimi ile PCR ürünüde mutant alel yok ise enzim kesimi gerçekleşmektedir. Ala189Val aleli için yapılan araştırmada PctI enzimi ile belirtilen bölgede mutant alel yok ise, PCR ürünü enzim tarafından kesilmektedir.

PCR ürünleri kesiminde G29A aleli için Mbo II, Ala307Thr aleli için Bse21I, Ser680Asn aleli için Bse1I ve Ala189Val aleli için PctI restriksiyon enzimleri kullanıldı. G29A, Thr307Ala, Ser680Asn ve Ala189Val varyantları için kullanılan RFLP şartları çizelge 2.8, çizelge 2.9, çizelge 2.10 ve çizelge 2.11’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.8. G29A aleli için RFLP şartları

Reaksiyon karışımı	G29A aleli	Reaksiyon şartları 37°C 16 saat
MboII	5U	
Enzim Tamponu	5 µl	
dH ₂ O	31,7µl	
PCR ürünü	12µl	
Toplam Hacim	50 µl	

Çizelge 2.9. Ala307Thr aleli için RFLP şartları

Reaksiyon karışımı	Ala307Thr aleli	Reaksiyon şartları 37°C 16 saat
Bse21 I	30U	
Enzim Tamponu	5 µl	
dH ₂ O	32,86µl	
PCR ürünü	12µl	
Toplam Hacim	50 µl	

Çizelge 2.10. Ser680Asn aleli için RFLP şartları

Reaksiyon karışımı	Ser680Asn aleli	Reaksiyon şartları 65°C 16 saat
Bse1I	20U	
Enzim Tamponu	5 µl	
dH ₂ O	39µl	
PCR ürünü	5µl	
Toplam Hacim	50 µl	

Çizelge 2.11. Ala189Val aleli için RFLP şartları

Reaksiyon karışımı	Ala189Val aleli	Reaksiyon şartları 37°C 16 saat
Pct I	30U	
Enzim	5µl	
Tamponu		
dH2O	34,8µl	
PCR ürünü	10µl	
Toplam Hacim	50 µl	

Kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde [2gr Agaroz, 100cc 1XTBE (Tris Borik Asit EDTA), 3.5µl Etidyum bromür] yürütülerek, elde edilen fragmanların büyüklüğüne göre hastanın genotipi belirlendi. Alel tiplerinin belirlenmesinde kullanılacak fragmanların büyüklüğü Çizelge 2.12'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.12. FSHR alellerinin RFLP modelleri ve genotipler

Polimorfizm/Mutasyon	Durum	Kesim noktası (nukleotit)	Fragman büyüklüğü (baz çifti)	Genotip
-29 G/A	Homozigot normal	5'...GAAGA(N) ₈ ...3'	296,122	GG
	Heterozigot	3'...CTTCT(N) ₇ ...5'	418,296,122	GA
	Homozigot mutant		418	AA
Ala307Thr; 919 G>A	Homozigot normal		328,36	GG
	Heterozigot	5'...CCTNAGG...3	364,328,36	GA
	Homozigot mutant	3'...GGANTCC...5'	364	AA
Ser680Asn; 2039 G>A	Homozigot normal		413,107	GG
	Heterozigot	5'...ACTGGNN...3'	520,413,107	GA
	Homozigot mutant	3'...TGACCN...5'	520	AA
Ala189Val; 566 C>T	Homozigot normal		58, 56	CC
	Heterozigot	5'..GAATGCNN...3'	104, 58, 56	CT
	Homozigot mutant	3'...CTTACGNN...5'	104	TT

2.2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel Analiz

İnfertil grup ile kontrol grubu arasında FSHR polimorfizmleri bakımından yapılan karşılaştırmada Ki-kare (χ^2) testi kullanılmıştır. Hormon değerleri ve genotipler arasındaki ilişki Kruskal Wallis testi ile saptanmıştır.

3.BULGULAR

Bu çalışma kapsamında 50 primer infertil kadın hasta ve 50 sağlıklı kadın birey olmak üzere 100 örnek incelendi.

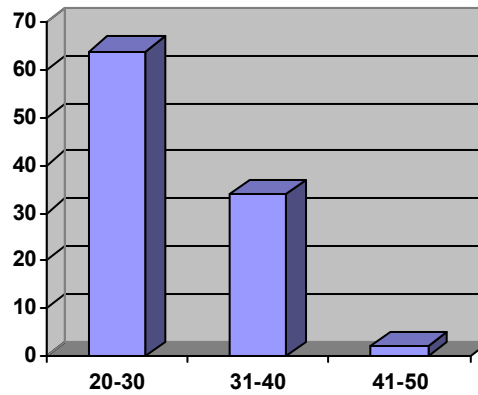
Çalışmaya dahil edilen primer infertil bireylerin özellikleri aşağıda verilmiştir.

Çalışmaya katılan hasta bireylerin yaşları 21-41 arasında evlilik süreleri 1-18 yıl arasında değişmekte idi. (Çizelge 3.1)

Çizelge 3.1 Hasta grubunun yaş ve evlilik süreleri

	Hasta grubu	
	Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (Min-Maks)
Yaş	28.9 $\pm$ 5.2	28.5 (21 - 41)
Evlilik süresi	5.5 $\pm$ 3.9	4 (1 - 18)

Hasta bireylerin %64'ü 20-30, %34'ü 31-40, %2'si 41-50 yaşları arasındadır. (Şekil 3.1)



Şekil 3.1 Hasta grubunun yaş dağılım yüzdeleri

Çalışmaya katılan hasta bireylerin FSH değerleri 3.17-32 IU/ml, LH değerleri 1.39-19 IU/ml, vücut Kitle İndeksi değerleri 18.6 – 33.5 değerleri arasındadır. (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2. Hasta grubunun hormon değerleri ve vücut kitle indeksi

	Hasta grubu	
	Ortalama $\pm$ SS	Ortanca (Min-Maks)
FSH	9 $\pm$ 6.2	6.7 (3.17 - 32)
LH	5.9 $\pm$ 3.7	4.7 (1.39 - 19)
Vücut Kitle İndeksi	24.9 $\pm$ 3.9	24.6 (18.6 – 33.5)

3.1. -29G/A Polimorfizmi

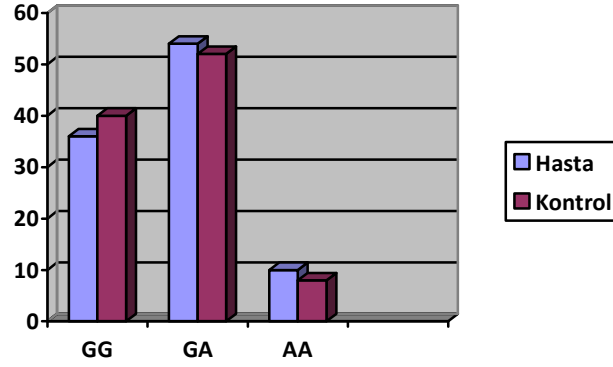
Çalışmamıza katılan 50 infertil ve 50 fertil olmak üzere 100 kadın bireye ait DNA' lar -29G/A polimorfizmi açısından çalışıldı.

Tespit edilen genotipler ve gözlenme sıklıkları Çizelge 3.3.'te verilmektedir.

Çizelge 3.3.. -29G/A Polimorfizmi için tespit edilen genotipler

		-29 G/A			TOPLAM
		GG	GA	AA	
Grup	Hasta	18	27	5	50
	Kontrol	20	26	4	50
Toplam		38	53	9	100

Çalışmamızın sonuçlarına göre hasta bireylerde %36 GG, %54 GA, %10 AA, kontrol bireylerde ise % 40 GG, % 52 GA ve % 8 AA genotipleri saptandı. (Şekil 3.2.)



Şekil 3.2. -29G/A Polimorfizmi için tespit edilen genotiplerin yüzdelik dağılımı

Tespit edilen aleller ve gözlenme sıklıkları Çizelge 3.4.'de verilmektedir.

Çizelge 3.4. -29G/A Polimorfizmi için tespit edilen aleller

	G	A	Toplam
Hasta	63	37	100
Kontrol	66	34	100

Hasta ve kontrol grubunda -29.bölge genotiplerinin dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. ($p=0,889$, $P>0,05$)

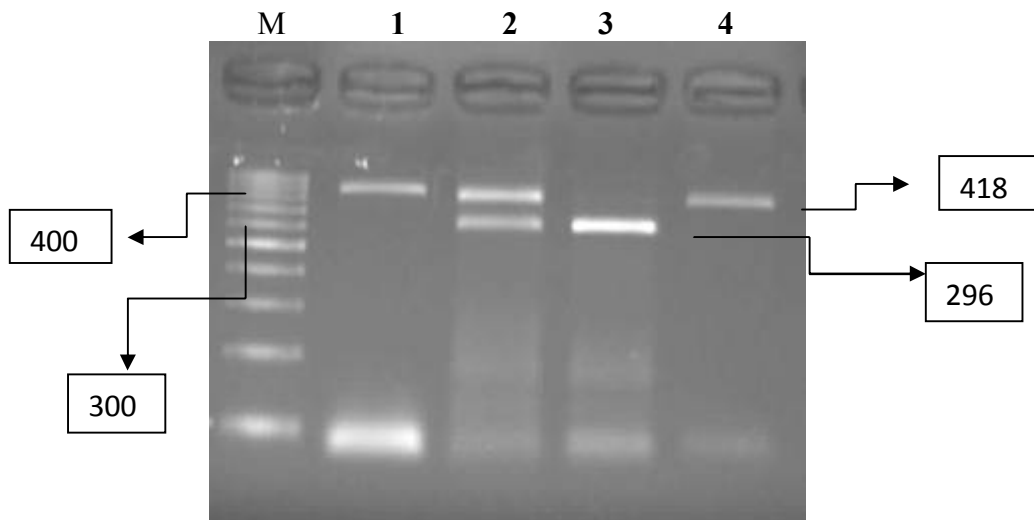
-29G/A polimorfizm genotipi ve bazal hormon değerleri arasındaki ilişki Çizelge 3.5'te verildi.

Çizelge 3.5. -29G/A polimorfizm genotipi ve hormon değerleri

	GG		GA		AA	
	Ort $\pm$ SS	Ortanca (Min- Max)	Ort $\pm$ SS	Ortanca (Min-Max)	Or $\pm$ SS	Ortanca (Min- Max)
FSH (IU/ml)	9.8 $\pm$ 6.7	6.9 (3.17- 24.8)	8.94 $\pm$ 6.5	6.7 (3.8-32)	6,4 $\pm$ 1,8	6.4 (4.05- 9.23)
LH (IU/ml)	6.3 $\pm$ 3.7	4.9 (3.53- 17.8)	5,83 $\pm$ 3.8	4.1 (1.39- 19)	4.8 $\pm$ 1,9	4.5 (3.14- 7.02)

-29G/A polimorfizmi genotipine göre FSH ($p=0.663$, $p>0.05$) ve LH ($p=0.592$, $p>0.05$) değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

-29G/A polimorfizmi için tespit edilen alellerin jel görüntüsü Şekil 3.3'te verildi. G29A alleli için kullanılan Mbo II enzimi ile PCR ürünüde mutant alel var ise enzim kesimi gerçekleşmemektedir.



Şekil 3.3. -29G/A polimorfizmi için tespit edilen alellerin %2' lik agaroz jel görüntüsü 1: Pcr Ürünü (418 bç) 2: GA (418/296 bç) 3:GG (296bç) 4: AA (418 bç)

3.2. Ala307Thr Polimorfizmi

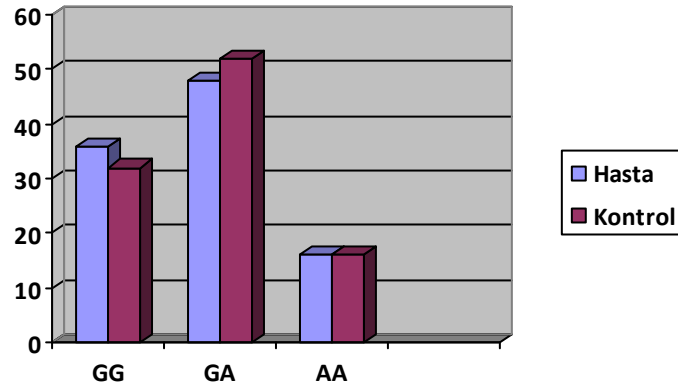
Çalışmamızda katılan 50 infertil ve 50 fertil olmak üzere 100 kadın bireye ait DNA'lar Ala307Thr polimorfizmi açısından çalışıldı.

Tespit edilen genotipler ve gözlenme sıklıkları Şekil 3.6'da verilmektedir.

Çizelge 3.6. 307G/A Polimorfizmi için tespit edilen genotipler

		307 G/A			TOPLAM
		GG	GA	AA	
Grup	Hasta	18	24	8	50
	Kontrol	16	26	8	50
Toplam		34	50	16	100

Çalışmamızın sonuçlarına göre 307. pozisyonda hasta bireylerde %36 GG, %48 GA ve %16 AA, kontrol bireylerde %32 GG, %52 GA ve % 16 AA genotipi saptandı.(Şekil 3.4.)



Şekil 3.4. 307G/A Polimorfizmi için tespit edilen genotiplerin yüzdelik dağılımı

Tespit edilen aleller ve gözlenme sıklıkları Çizelge 3.7.'de verilmektedir.

Çizelge 3.7.. 307 G/A Polimorfizmi için tespit edilen aleller

	G	A	Toplam
Hasta	60	40	100
Kontrol	58	42	100

Hasta ve kontrol grubunda 307. pozisyonda genotiplerinin dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,906$, $p>0,05$).

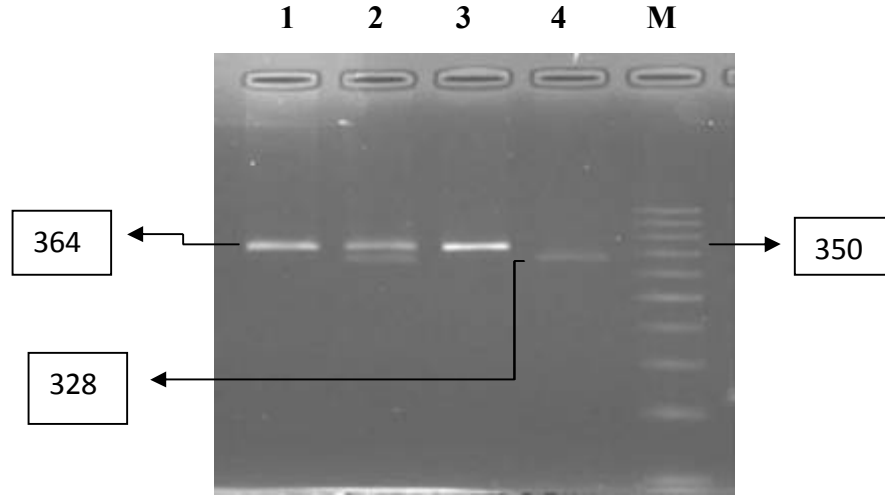
Ala307Thr polimorfizm genotipi ve bazal hormon değerleri arasındaki ilişki Çizelge 3.8.'de verildi.

Çizelge 3.8. Ala307Thr polimorfizm genotipi ve hormon değerleri

	GG		GA		AA	
	Ort ± SS	Ortanca (Min-Max)	Ort ± SS	Ortanca (Min-Max)	Ort ± SS	Ortanca (Min-Max)
FSH (IU/ml)	7.8±3.2	6.9 (4.95-18,□5)	10.4±7.83	7 (3.8-32)	7.5±5.7	6.6 (3.17-21.32)
LH (IU/ml)	6.7±3.7	5.9 (3.53-17.8)	5,9±4.1	4 (1.39-19)	4.8±1,3	4.1 (3.14-7.02)

Ala307Thr polimorfizmi genotipine göre FSH ($p=0,360$, $p>0.05$) ve LH ($p=0.316$, $p>0.05$) değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Ala307Thr polimorfizmi için tespit edilen alellerin jel görüntüsü Şekil 3.5'te verilmiştir. Ala307Thr aleli için kullanılan Bse21I enzimi ile PCR ürünüde mutant alel yok ise enzim kesimi gerçekleşmektedir.



Şekil 3.5. Ala307Thr polimorfizmi için tespit edilen alellerin % 2' lik agaroz jel görüntüsü 1: Pcr Ürünü (364 bç) 2: T/A (364/328 bç) 3: TT (364 bç) 4: AA (328 bç)

3.3. Ser680Asn Polimorfizmi

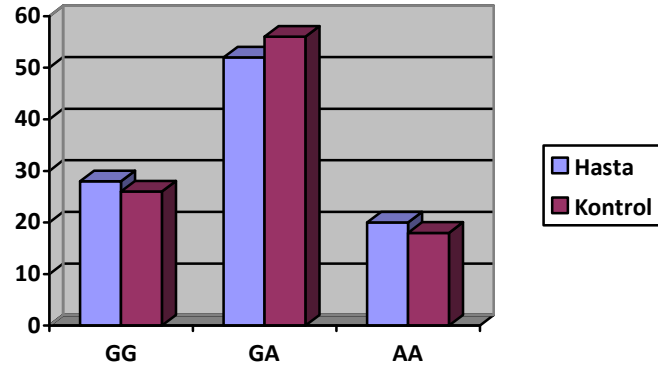
Çalışmamızda katılan 50 infertil ve 50 fertil olmak üzere 100 kadın bireye ait DNA' lar Ser 680 Asn polimorfizmi açısından çalışıldı.

Tespit edilen genotipler ve gözlenme sıklıkları Çizelge 3.9'da verilmektedir.

Çizelge 3.9. 680 G/A Polimorfizmi için tespit edilen genotipler

		680 G/A			TOPLAM
		GG	GA	AA	
Grup	Hasta	14	26	10	50
	Kontrol	13	28	9	50
Toplam		27	54	19	100

Çalışmamızın sonuçlarına göre 680.pozisyonda hasta bireylerde %28 GG, %52 GA, %20 AA, kontrol bireylerde %26 GG, %56 GA, %18 AA genotipi saptandı. (Şekil 3.6)



Şekil 3.6. 680G/A Polimorfizmi için tespit edilen genotiplerin yüzdelik dağılımı

Tespit edilen aleller ve gözlenme sıklıkları çizelge 3.10’da verilmektedir.

Çizelge 3.10. 680 G/A Polimorfizmi için tespit edilen aleller

	G	A	Toplam
Hasta	54	46	100
Kontrol	54	46	100

Hasta ve kontrol grubunda 680.pozisyonda genotiplerinin dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. ($p=0,921$, $p>0,05$)

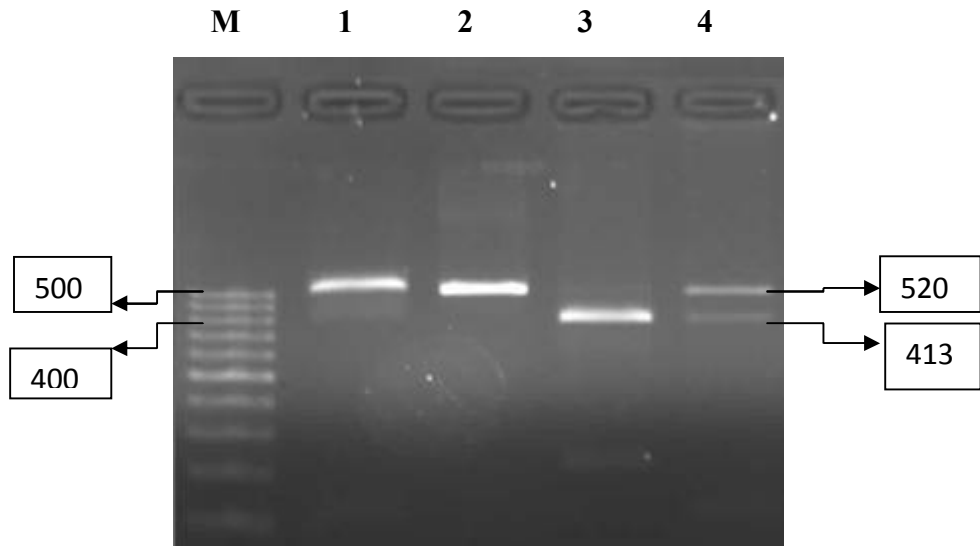
Ser680Asn polimorfizm genotipi ve bazal hormon değerleri arasındaki ilişki Çizelge 3.11’de verildi.

Çizelge 3.11. Ser680Asn polimorfizm genotipi ve hormon değerleri

	GG		GA		AA	
	Ort $\pm$ SS	Ortanca (Min-Max)	Ort $\pm$ SS	Ortanca (Min-Max)	Or $\pm$ SS	Ortanca (Min-Max)
FSH (IU/ml)	8.4 $\pm$ 4	7.5 (4.98-21.35)	10 $\pm$ 7.6	6.5 (3.8-32)	7.3 $\pm$ 5.1	6.6 (3.17-21.32)
LH (IU/ml)	7.5 $\pm$ 4.2	6.4 (3.53-17.8)	5.6 $\pm$ 3.9	4 (1.39-19)	4.6 $\pm$ 1,1	4.1 (3.14-7.02)

Ser680Asn polimorfizmi genotipine göre FSH ($p=0,260$, $p>0.05$) ve LH ($p=0.155$, $p>0.05$) değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Ser680Asn polimorfizmi için tespit edilen alellerin jel görüntüsü Şekil 3.7’de verilmiştir. Ser680Asn aleli için kullanılan BseI enzimi ile PCR ürünüde mutant alel yok ise enzim kesimi gerçekleşmektedir.

**Şekil 3.7.** Ser680Asn polimorfizmi için tespit edilen alellerin % 2’ lik agaroz jel görüntüsü. 1:Pcr Ürünü (520bç) 2: NN (520bç) 3: SS (413bç) 4:NS (520/413)

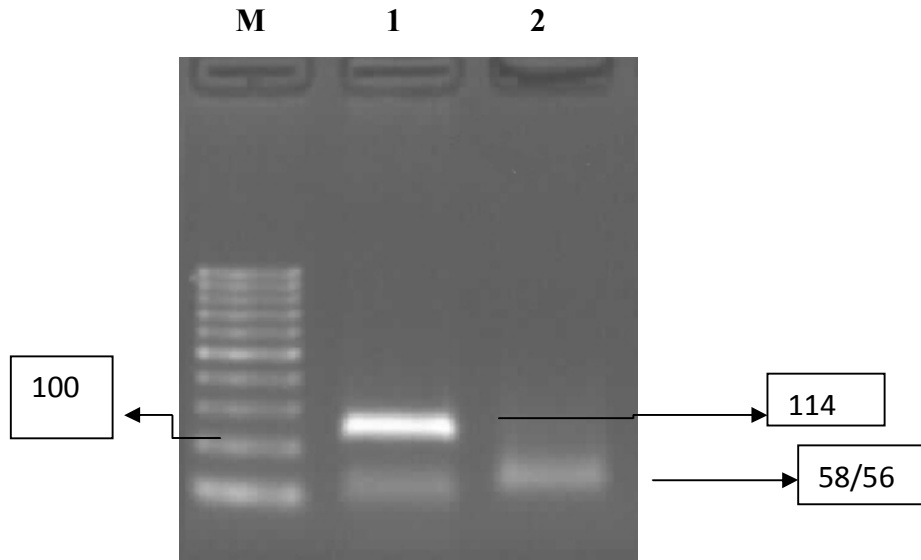
3.4. Ala 189 Val mutasyonu

Hasta ve kontrol grubunda 189. pozisyonda mutasyon tespit edilmedi.(Çizelge 3.12)

Çizelge 3.12. 189 C/T Mutasyonu için tespit edilen aleller

		189 C/T	TOPLAM
		CC	
Grup	Hasta	50	50
	Kontrol	50	50
Toplam		100	100

Ala189Val mutasyonu için tespit edilen alellin jel görüntüsü Şekil 3.8’de verilmiştir. Ala189Val aleli için yapılan araştırmada PctI enzimi ile belirtilen bölgede mutant alel yok ise, PCR ürünü enzim tarafından kesilmektedir.



Şekil 3.8. Ala189Val mutasyonu için tespit edilen alellin % 2' lik agaroz jel görüntüsü 1: Pcr Ürünü (114 bç) 2: A/A (56/58 bç)

3.5. Haplotip Analizi

Çalışmaya katılan 50 primer infertil, 50 fertil konrole ait FSH Reseptör G919A-G2039A haplotiplerinin analizleri çizelge 3.13'te gösterilmiştir.

Sonuçlarımıza göre G919A-G2039A/G919A-G2039A (GA-GA) genotipi hem hasta (%42) hem de kontrol (%48) bireyler arasında en sık rastlanan genotip olarak bulundu. G919-G2039/G919-G2039 (GG-GG) genotip her iki grupta 2. en sık rastlanan genotiptir ve her iki grupta da eşit oranda (%24) saptandı.

Çizelge 3.13. FSH Reseptör G919A-G2039A Haplotiplerinin Hasta ve Kontrol Bireyler Arasındaki Dağılım Sıklıkları

		Frekans	Yüzde
Hasta	G919G-G2039G	12	24
	G919G-G2039A	2	10
	G919G-A2039A	1	2
	G919A-G2039G	2	4
	G919A-G2039A	21	42
	G919A-A2039A	1	2
	A919A-A2039A	8	16
	Toplam	50	100
Kontrol	G919G-G2039G	12	24
	G919G-G2039A	3	6
	G919G-A2039A	1	2
	G919A-G2039G	1	2
	G919A-G2039A	24	48
	G919A-A2039A	1	2
	A919A-G2039A	1	2
	A919A-A2039A	7	14
	Toplam	50	100

Çalışmaya katılan 50 primer infertil, 50 fertil konrole ait FSH Reseptör -29G/A-G919A-G2039A haplotiplerinin analizleri Çizelge 3.14'te gösterilmiştir.

-29GG-G919A-G2039A haplotipi hasta bireylerde %4, kontrol bireylerde %20 oranında saptandı.

Çizelge 3.14. FSH Reseptör -29G/A-G919A-G2039A Haplotiplerinin Hasta ve Kontrol Bireyler Arasındaki Dağılım Sıklıkları

		Frekans	Yüzde
Hasta	-29GG-G919G-G2039G	7	14
	-29GA-G919G-G2039G	5	10
	-29GG-G919G-G2039A	3	6
	-29GA-G919G-G2039A	1	2
	-29AA-G919G-G2039A	1	2
	-29GA-G919G-A2039A	1	2
	-29GG-G919A-G2039G	1	2
	-29GA-G919A-G2039G	1	2
	-29GG-G919A-G2039A	2	4
	-29GA-G919A-G2039A	17	34
	-29AA-G919A-G2039G	2	4
	-29GG-G919A-A2039A	1	2
	-29GG-A919A-A2039A	4	8
	-29GA-A919A-A2039A	2	4
	-29AA-A919A-A2039A	2	4
	Toplam	50	100
Kontrol	-29GG-G919G-G2039G	5	10
	-29GA-G919G-G2039G	7	14
	-29GG-G919G-G2039A	2	4
	-29AA-G919G-G2039A	1	2
	-29GG-G919G-A2039A	1	2
	-29GA-G919A-G2039G	1	2
	-29GG-G919A-G2039A	10	20
	-29GA-G919A-G2039A	11	22

	-29AA-G919A-G2039A	3	6
	-29GA-G919A-A2039A	1	2
	-29GA-A919A-G2039A	1	2
	-29GG-A919A-A2039A	2	4
	-29GA-A919A- A2039A	5	10
	Toplam	50	100

-29G-G919A-G2039A haplotipinin diğer haplotiplere göre frekansı Çizelge 3.15'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.15. -29GG-G919A-G2039A haplotipinin frekansı

	-29 GG-G919A-G2039A	Diğer	
Kontrol	10	40	50
Hasta	2	48	50

-29G-G919A-G2039A haplotipinin frekansı hasta bireylere göre kontrol bireylerde anlamlı düzeyde ($p=0.014$) daha yüksek bulundu.

4.TARTIŞMA

Kadınlarda normal reproduktif fonksiyon için gerekli düzenli ovulatuvar sikluslar, hipotalamus, hipofiz ve overden gelen uyarıcı ve inhibe edici sinyallerin düzenli gerçekleşmesi ile sağlanır (Strauss ve Barbieri, 2006). Üreme fonksiyonu, gonadlarda steroid sentezi ve gametogenezi düzenleyen hipofiz kaynaklı gonadotropinler, FSH ve LH ve bu iki hormonun çeşitli şekillerde regüle edilmesi ile kontrol edilir (Bükülmez ve Arıcı, 1996). FSHR'ü reproduktif dokularda eksprese edilir ve hipofiz bezinden salınan FSH'a cevap olarak reproduktif aktiviteyi kontrol eder. Kadınlarda FSHR'ü gelişen folikülün granüloza hücrelerinde bulunur ve FSH'a cevap olarak granüloza hücrelerinin bölünmesini artırır ve foliküler steroid hormonları üretmesi için stimüle eder. (Chedrese, 2009).

Kadın ve erkek üreme sisteminin temelini hipotalamus-hipofiz-gonadal aks oluşturur. Bu sistemin bozulması gonadların patofizyolojisini bozarak infertiliteye ve bazı durumlarda malignansilere neden olabilir (Strauss ve Barbieri, 2006).

FSHR'de 731 TNP bulunmaktadır. Bunların sadece 5 tanesi kodlayan bölgede (ekzon), diğerleri intronlarda bulunmaktadır. TNP'lerden bir tanesi FSHR mRNA'sının 29. pozisyonunda 5' translayon olmayan bölgede bulunur. Kodlayan bölgedeki TNP'ler (307, 680) ekzon 10'da bulunur. Ala307Thr (G919A) ve Ser680Asn (G2039A) polimorfizmlerinin frekansı ve etnik dağılımları iyi tanımlanmıştır (Gromoll ve Simoni, 2005). FSHR'nin inaktive edici mutasyonu, proteinin ekstraselüler ligand bağlanma bölgesinde bulunmuştur. Ekzon 7' de bir C566T transisyonu 189. rezidüde Ala' nin Val'ne yer değiştirmesine neden olur (Tapanainen, 1998).

Bizim çalışmamızda -29, Ala307Thr ve Ser680Asn polimorfizmlerinin ve C566T mutasyonunun genotiplerinin dağılımları 50 primer infertil kadın hasta ve 50 fertil sağlıklı kontrol bireyde araştırıldı.

4.1. -29 Polimorfizmi

Çalışmamızın sonuçlarına göre hasta bireylerde %36 GG, %54 GA, %10 AA, kontrol bireylerde ise % 40 GG, % 52 GA ve % 8 AA genotipleri saptandı. Hasta ve kontrol grubunda -29.bölge genotiplerinin dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p= 0,889$, $P >0,05$).

Kontrollü ovaryan stimülasyon tedavisi gören 202 Alman, 55 Endonezyalı kadınla yapılan bir çalışmada, Alman kadınlar arasında -29.pozisyondaki genotip sıklıkları G/G (%55.4), G/A (%37.6), ve A/A (%6.9) iken Endonezyalı kadınlarda G/G (%29), G/A (% 49), ve A/A (%22) olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızla uyumlu olarak bu çalışmada da -29.pozisyondaki TNP ile basal FSH seviyeleri arasında bir korelasyon bulunmamıştır (Wunsch ve ark., 2005).

Erkek faktör veya tubal faktör nedeniyle üremeye yardımcı teknikler (ÜYT) ile tedavi gören Hintli 50 normogonadotropik ovulatuvar kadın ve 100 sağlıklı fertil kontrol kadının katıldığı çalışmada GA genotipi her iki grupta da sık görülürken, GG genotipi kontrol bireylerde %5, infertil bireylerde %32 oranında, AA genotipi kontrol bireylerde %1, infertil bireylerde %14 oranında saptanmıştır (Acherekar ve ark., 2009). GA genotipi bizim çalışmamızda da her iki grupta sık görülmesine rağmen GG ve AA genotiplerinin dağılımı iki çalışma arasında farklılık göstermektedir. Her iki çalışmada da bazal FSH ve LH konsantrasyonları gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemektedir.

Acherekar ve arkadaşlarının primer ve sekonder amenoreli 86 kadın ve 100 kontrol bireylerle yaptığı bir çalışmada -29. Pozisyonda AA genotipi amenoreik kadınlarda kontrol bireylere göre daha yüksek prevalansa sahiptir. Ayrıca AA genotipine sahip primer amenoreli bireylerin serum FSH değerlerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Acherekar ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda GG genotipine sahip hasta bireylerin FSH seviyeleri 6.9 IU/ml, GA genotipine sahip hasta bireylerin FSH seviyeleri 6.7 IU/ml ve AA genotipine sahip hasta bireylerin FSH seviyeleri 6.4 IU/ml'tür. Sonuçlarımıza göre -29G/A polimorfizmi genotipine göre FSH değerleri

arasında anlamlı bir fark bulunmadı.($p=0.663$, $p>0.05$). -29G/A polimorfizmi Türk populasyonundaki kadınlarda ilk kez bakılmış olup, sonuçlarımız bu açıdan da önem taşımaktadır.

4.2. Ala307Thr ve Ser680Asn Polimorfizmleri

Çalışmamızın sonuçlarına göre 307. pozisyonda hasta bireylerde %36 GG, %48 GA ve %16 AA, kontrol bireylerde %32 GG, %52 GA ve % 16 AA genotipi saptandı. Hasta ve kontrol grubunda 307.pozisyonda genotiplerinin dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p= 0,906$, $p >0,05$).

680.pozisyonda hasta bireylerde %28 GG, %52 GA, %20 AA, kontrol bireylerde %26 GG, %56 GA, %18 AA genotipi saptandı. Hasta ve kontrol grubunda 680.pozisyonda genotiplerinin dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. ($p= 0,921$, $p >0,05$)

Ünsal ve arkadaşlarının Türk populasyonunda 44'ü polikistik over sendromlu 50'si kontrol olmak üzere 94 birey ile yaptığı bir çalışmada, 307.pozisyonda hasta bireylerin %36'sı homozigot Thr, %43'ü heterozigot Thr/Ala, %21'i homozigot Ala, kontrol bireylerin %32'si homozigot Thr, %50'si heterozigot Thr/Ala, %18'i homozigot Ala olarak saptanmıştır. 680.pozisyonda hasta bireylerin %30'u homozigot Asn, %45'i heterozigot Ser/Asn, %25'i homozigot Ser, kontrol bireylerin %28'i homozigot Asn, %54'ü heterozigot Ser/Asn, %18'i homozigot Ser genotipine sahiptir. Bu çalışmada da her iki grupta 307. ve 680. pozisyonlarda heterozigot genotipe sahip birey oranı diğer genotiplere göre daha fazladır ancak sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlam saptanmamıştır (Ünsal ve ark., 2009). Çalışmamız bu tek nukleotid polimorfizmlerinin Türk toplumundaki kadınlarda bakıldığı 2. çalışma olup, genotip frekansları açısından her iki çalışmada sonuçların Türk populasyonu için uyumlu olduğu gözlemlendi.

Achrekar ve arkadaşlarının Hintli kadınlarla yaptığı bir çalışmada 307.pozisyonadaki polimorfizmler bakımından yardımcı üreme teknikleri kullanılan bireylerin %24'ü AA (TT) , %53'ü AG (TA), %23'ü GG (AA), kontrol bireylerin %24'ü AA (TT) , %62'si AG (TA), %14'ü GG (AA) olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada 680.pozisyonadaki polimorfizmler bakımından üremeye yardımcı teknikler kullanılan bireylerin %31'i AA (NN) , %56'sı AG (NS), %13'ü GG (SS), kontrol bireylerin %42'si AA (NN), %46'sı AG (NS), %12'si GG (SS) olarak saptanmıştır. Ovulasyon indüksiyonu için gerekli olan FSH miktarının 307. pozisyonunda homozigot alanin olan bireylerde diğer genotiplerle karşılaştırıldığında daha az olduğu gösterilmiştir (Achrekar ve ark., 2009). Kendi çalışmamızın sonuçları ile karşılaştırdığımızda her iki çalışmada da hem hasta hem de kontrol bireyler arasında 307 ve 680.pozisyonlarda heterozigot genotipe sahip bireylerin oranı daha fazla görülmektedir; ancak her iki çalışmada da bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Livshyts ve arkadaşlarının Ukrayna'da 102'si over disfonksiyonu (FSH 25 IU/ml'dan yüksek) olan, 39'u zayıf cevap veren (FSH 1-9.6 IU/ml) hastalar ve kontrol grubu olarak da kontrollü ovaryan hiperstimülasyonuna iyi cevap veren 40, doğal yol ile 35 yaşından önce çocuk sahibi olmuş 130 (kontrol grubu I) ve doğal yol ile 35 yaşından sonra çocuk sahibi olmuş 63 (kontrol grubu II) normoovulatuvar toplam 374 kadınla yaptığı çalışmada 919G-2039G/919G-2039G genotipinin ovaryan disfonksiyonu olan kadınlarda (%26) ve zayıf cevap veren grupta (%33.3), iyi cevap veren (%12.5), kontrol grubu I (%7.7) ve kontrol grubu II' yi (%17.5) oluşturan kadınlardan daha sık görüldüğü saptanmıştır (Livshytsve ark., 2009). Bizim çalışmamızda G919A-G2039A (Ala307Thr-Ser680Asn/Ala307Thr-Ser680Asn) genotipi hem hasta (%42) hem de kontrol (%48) bireyler arasında en sık rastlanan genotip olarak bulundu. G919G-G2039G (Ala307-Ser680/Ala307-Ser680) ise her iki grupta da eşit oranda (%24) saptandı.

FSHR varyantlarının Çinli prematür ovaryan yetmezliği olan 40 ve polikistik over sendromu olan 60 kadın ve 92 sağlıklı kontrol bireyde araştırıldığı başka bir çalışmada kontrol grubu ve hastalar arasında alel ve genotip frekansı arasında

anlamli bir fark bulunmamıştır (Du ve ark., 2010). Çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir.

Achrekar ve arkadaşlarının Hint kökenli primer amenoreli, sekonder amenoreli ve kontrol bireyleri içeren 186 kadın ile yaptığı çalışmada A919A-A2039G , A919A-G2039G, A919G-G2039G, G919G-A2039A ve G919G-A2039G haplotiplerinin prevalansının amenoreli örneklerde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Primer ve sekonder amenoreli kadınların serum FSH ve LH seviyeleri arasında 307 ve 680. pozisyonlar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Achrekar ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda A919A-A2039G haplotipi hasta bireylerde saptanmazken, kontrol bireylerden sadece 1 kişide saptanmıştır. A919A-G2039G haplotipi hasta ve kontrol bireylerde saptanmamıştır. A919G-G2039G, G919G-A2039A ve G919G-A2039G haplotipleri ise hem hasta hem de kontrol bireyler arasında düşük oranda saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da serum FSH ve LH seviyeleri ile 307 ve 680. pozisyonlar arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

Sudo ve arkadaşlarının 258'si kontrol olmak üzere 522 Japon kadınla yaptığı çalışmada tüm kadınlarda A919A-A2039G %41, A919G-A2039G %46.9 ve G919G-G2039G %12.1 oranında bulunmuştur. G919G-G2039G grupta bazal serum FSH seviyeleri, A919G-A2039G grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur (Sudo ve ark., 2002). A919G-A2039G haplotipi bizim çalışmamızda da hem hasta hem de kontrol bireyler arasında en sık saptanan haplotipti. G919G-G2039G haplotipi her iki grupta da en sık rastlanan ikinci haplotip olarak saptandı, ancak serum FSH seviyeleri ile 307 ($p=0,360$, $p>0.05$) ve 680. ($p=0,260$, $p>0.05$) pozisyonlar arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

Sundblad ve arkadaşlarının 20 prematür ovaryan yetmezliği olan kadın ve 44 kontrol bireyle Arjantin'de yaptığı bir çalışmada 307 ve 680.pozisyonların alelik varyantlarının ya da homozigot genotiplerin bizim çalışmamızla uyumlu olarak hastalık riski ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir (Sundblad ve ark., 2004).

Perez ve arkadaşları infertilite teşhisi, erkek faktöre, tubal faktöre ve her iki faktöre bağlı olarak konulmuş 161 kadınla Almanya’da yaptıkları çalışmada %29 Asn680Asn, %45 Asn680Ser, %26 Ser680Ser varyantı saptamıştır. Her üç grupta da bazal FSH seviyeleri anlamlı derecede farklılık göstermiştir. Bazal FSH değerleri Asn680Asn için 6.4 ± 0.4 IU/ml, Asn680Ser için 7.9 ± 0.3 IU/ml, Ser680Ser 8.3 ± 0.6 IU/ml olarak bulunmuştur (Perez ve ark., 2000). Bizim çalışmamızda 680.pozisyonda GG(Ser680Ser) genotipine sahip hasta bireylerin FSH seviyeleri 7.5 IU/ml, GA (Asn680Ser) genotipine sahip hasta bireylerin FSH seviyeleri 6.5 IU/ml, AA (Ser680Ser) genotipine sahip hasta bireylerin FSH seviyeleri 6.6 IU/ml’dir (Çizelge nosu). Sonuçlarımıza göre 680G/A polimorfizmi genotipine göre FSH değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,260$, $p>0.05$).

Laven ve arkadaşlarının Hollandalı 148 hasta, 30 kontrol bireyle yaptığı çalışmada kontrol bireylerde Ala307Ala %16, Ala307Thr %32, Thr307Thr %52 oranında, normogonadotropik anovulatuvar kadınlarda Ala307Ala %20, Ala307Thr %57, Thr307Thr %23 oranında saptanmıştır. Kontrol bireylerde Asn680Asn %23, Asn680Ser %61, Ser680Ser %16 oranında, normogonadotropik anovulatuvar kadınlarda Asn680Asn %16, Asn680Ser %44, Ser680Ser %40 oranında saptanmıştır. Her iki polimorfizm için hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı derecede farklılık saptanmıştır, ancak her iki polimorfizmin haplotipleri hasta ve kontrol grubunda farklılık göstermemektedir. Serum FSH konsantrasyonları Ser680Ser genotipine sahip bireylerde, Asn680Ser ve Asn680Asn genotipine sahip bireylerden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Laven ve ark., 2003). Sonuçlarımıza göre 307G/A ($p=0,360$, $p>0.05$) ve 680G/A ($p=0,260$, $p>0.05$) polimorfizmi genotipine göre FSH değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Conway ve arkadaşlarının İngiltere’de 49 premature ovaryan yetmezliği, 5 dirençli yumurtalık sendromu, 93 polikistik over sendromu olan kadın ve 51 kontrol bireyle yaptıkları çalışmada Thr307/Ser680 varyantı tüm gruplarda benzer sıklıkta görülmüştür (Conway ve ark., 1999).

Kafkas, Asya, Hint, Kreole ve Akdeniz kökenli 1771 kadınla yapılan bir çalışmada FSHR polimorfizm dağılımı etnik gruplarda farklılık göstermiştir. Çalışmaya göre Kafkas ve Asya kökenli bireyler arasında ve Asya ve Akdeniz kökenli bireyler arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. Sonuçlara göre Kafkas ve Akdeniz kökenlilere göre Asya kökenli bireylerde Ser680Ser varyantı daha düşük, Asn680Asn varyantı daha fazla görülmektedir. Düzenli menstrual döngüye sahip kadınlarda Ser680Ser reseptör varyantına sahip olanların FSH konsantrasyonlarının Asn680Ser varyantına sahip olanlardan daha yüksek olduğu saptanmıştır, ancak yaş ve östradiol konsantrasyonları için düzenleme yapıldığında polimorfizmlere göre FSH konsantrasyonları arasında bir fark saptanmamıştır (Kuijper ve ark., 2010). Bizim sonuçlarımıza göre Türk popülasyonundaki kadınlarda Kafkas ve Akdeniz kökenli bireylerle benzer olarak Ser680Ser varyantı (%27), Asn680Asn varyantına (%19) göre daha sık gözlemlendi; ancak 2039G/A polimorfizmi genotipine göre FSH değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,260$, $p>0.05$).

TNP'ler insanlardaki genetik varyasyonun en yaygın formudur. Polimorfizmlerin popülasyonda görülme sıklığı %1'den fazladır. Haplotipler aynı kromozomda bulunan alel kombinasyonlarıdır (Velasquez ve Lipkin, 2007). Son yıllarda yapılan polimorfizm çalışmalarının bazılarında TNP'lerinin her birinin ayrı ayrı öneminden çok birden fazla TNP kombinasyonu söz konusu olduğunda bu haplotipi taşıyanlarda hastalıklara yatkınlık veya hastalıklardan korunmak ile ilgili fenotipik etkinin en belirgin düzeye ulaştığı vurgulanmaktadır.

Literatürde hastalıklar ile haplotipler arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda çalışma vardır. Parkinson hastalığı üzerine MDR1 haplotipi riskini araştırıldığı bir çalışmada e21/2677T–e26/3435T haplotipinin insidansının Parkinson hastalığına sahip bireylerde, kontrol grubundan daha az olduğu görülmüş ve bu haplotipin Çinlilerde Parkinson Hastalığına karşı koruyucu olabileceği bildirilmiştir (Tan ve ark., 2005). Vitamin D reseptör gen polimorfizmlerinin kolorektal kanserle ilişkisinin araştırıldığı çalışmada varyantların tek başlarına kolorektal kanserle ilişkisi saptanamamasına rağmen BsmI(G)-TaqI(C) ve BsmI(A)-TaqI(T) haplotiplerine sahip bireyler daha çok kontrol grubunda olduğundan, bu iki haplotipin kolorektal kansere karşı koruyucu bir

etkisi olabileceği gösterilmiştir (Flügge ve ark., 2007). Wheezing rahatsızlığı ile beta2 adrenerjik reseptör arasındaki ilişkinin araştırıldığı Tayvanlı çocuklarda yapılan çalışmada Gly16/Glu27 haplotipinin kontrol bireylerde hasta bireylerden daha sık görüldüğü dolayısı ile hastalığa karşı koruyucu etkisinin olabileceği öne sürülmektedir (Lee ve ark., 2009).

Çalışmalar, spermatogenetik bozukluklarda, FSHR tek nükleotid polimorfizmlerinin (-29. pozisyon ile ekzon 10'daki 307 ve 680. pozisyonundaki polimorfizmler) birlikte oluşturdukları haplotiplerin bir çok genetik faktörden biri olabileceğini göstermektedir ancak bu üç tek nükleotid polimorfizminin yumurtalık fonksiyonu üzerine birlikte olan etkisi araştırılmamıştır.

Pengo ve arkadaşlarının İtalya'da 215 infertil ve 315 kontrol erkek bireyle yaptığı çalışmada 3 bölgeyi kapsayan haplotip analizine göre gruplar arasında fark bulunamamıştır (Pengo ve ark., 2006).

Ahda ve arkadaşlarının Almanya'da 304 kontrol ve 438 infertil erkek bireyler yaptığı bir çalışmada -29A-G919G-G2039G haplotipi hasta bireylerde (%9.1), sağlıklı bireylerden (%5.4) daha sık gözlenmiştir. -29G-A919A-A2039A haplotipi ise hasta bireylerde (%33.1) kontrol bireylerden (%40.6) daha az sıklıkta gözlenmiştir. FSH seviyeleri ile FSHR genotipi arasında bir korelasyon tespit edilememiştir (Ahda ve ark., 2005).

Lend ve arkadaşlarının Estonya'da 150 infertil ve 208 kontrol örnekle yaptığı çalışmada -29G-A919A-A2039A haplotipinin normospermik erkeklerde (%38.4) azospermik erkeklerden (%33.9) daha sık görüldüğü saptanmıştır ve bu haplotipin erkek infertilitesine karşı koruyucu olabileceği belirtilmiştir (Lend ve ark., 2010).

Biz yaptığımız çalışmada -29GG-G919A-G2039A haplotipini hasta grubunda %4, kontrol grubunda ise %20 oranında saptadık. Lend ve Ahda'nın yaptığı çalışmalarla karşılaştırıldığında, bizim çalışmamızda kadın fertilitésinin korunmasında önemli olabileceğini düşündüğümüz haplotipte de -29.pozisyonda homozigot GG genotipi

saptandı. Diğer iki çalışmada 307. pozisyon homozigot Thr, 680. pozisyon homozigot Asn olarak saptanmıştı. Ancak biz kendi çalışmamızda bu pozisyonları heterozigot (Ala307Thr ve Ser680Asn) olarak saptadık. Bu sonuçlara göre Lend ve arkadaşlarının, Ahda ve arkadaşlarının çalışma sonuçlarıyla birleştirerek Avrupa’da erkeklerde fertilite üzerine FSHR polimorfizmlerinin etkilerini inceledikleri meta analiz sonuçlarıyla bizim bulgularımız kısmen örtüşmektedir.

Bu haplotip analizleri, bilgilerimize göre kadınlar üzerinde yapılmış ilk çalışma olup, sonuçlarımız -29GG-G919A-G2039A haplotipinin kadınlarda fertilite üzerinde koruyucu etkisini ilk kez göstermesi bakımından önemlidir.

FSH reseptöründe -29. pozisyonadaki TNP, c-E- *twenty-six* (c-ETS) transkripsiyon faktörü için bağlanma bölgesi sunan, GG/AAA konsensus sekansında bulunduğundan (Gromoll ve Simoni, 2005) bu pozisyonda A alelinin bulunması transkripsiyonel aktiviteyi etkileyebilir (Achrekar, 2009). 10.ekzon ekstraselüler bölgenin C-terminalini, transmembran bölgeyi ve intraselüler bölgeyi kodlar. Ekzon 10 ligand bağlanması için gerekli olmasa da sinyal transdüksiyonu için gereklidir. 307. kodon hormon bağlanma bölgesinin transmembran bölgesine bağlayan kısmında bulunur ve 307. pozisyon diğer glikoprotein hormon reseptörlerinde korunmamıştır. İntraselüler C-terminal bölgede bulunan 680.kodon da 3 glikoprotein hormon reseptöründe de farklılık gösterir. 307. ve 680. pozisyonlardaki aminoasitlerin özel bir rolü olmadığı düşünülmektedir (Wunsch ve ark., 2007), ancak FSHR’nün intraselüler bölgesindeki Ser, Thr rezidülerinin fosforillenmesi adenilil siklazdan ayrılmayı etkileyebileceği üzerinde durulmaktadır. 680. Pozisyonda Ser bulunması FSHR proteinin post-translasyonel modifikasyonunu ve FSH etkinliğini de içeren reseptör fonksiyonunda değişime neden olabileceği öngörülmektedir (Ünsal ve ark., 2009).

Kadın fertilitesi için koruyucu olabileceğini düşündüğümüz -29G-G919A-G2039A haplotipinde, -29.pozisyonda homozigot GG genotipinin bulunması, bu pozisyonda c-E- *twenty-six* (c-ETS) transkripsiyon faktörü için bağlanma bölgesinde bir değişim olmadığını göstermektedir, bu nedenle genin transkripsiyonel aktivitesinde değişim

olmayacaktır. 680. pozisyonda Ser bulunmasının FSHR proteinin post-translasyonel modifikasyonunu ve FSH etkinliğini de içeren reseptör fonksiyonunda değişime neden olabileceği düşünülmektedir ancak bizim çalışmamızda koruyucu olduğunu düşündüğümüz haplotipte 680.pozisyonun heterozigot olarak saptanmasından dolayı reseptör fonksiyonunda değişim gerçekleşmeyebilir.

Bizim sonuçlarımızın bir başka açıklaması da bu TNP'lerle bağlantılı aktarılan henüz tanımlanmamış, fertilite üzerine koruyucu etkili başka genetik faktörlerin olabileceğidir. FSHR geninin kodlanan ve kodlanmayan bölgelerinde düşük sıklıkta da olsa farklı polimorfizmler olduğu şüphesizdir. Bu varyasyonlar tek başlarına veya diğer genetik değişimlerle birlikte fertilite üzerinde değişime neden olabilir. Dolayısı ile daha büyük gruplarla bu nadir görülen polimorfizmlerin fertilite üzerindeki etkisini saptamaya yönelik çalışmalar da yapılmalıdır.

Bu tez çalışmasında üç adet TNP'nin kadın fertilitesi üzerine etkileri ayrı ayrı ve birlikte incelendi. Bu TNP'lerin kadın fertilitesi üzerine birlikteki etkilerini inceleyen literatürdeki ilk araştırma olan çalışmamızda -29GG-G919A-G2039A haplotipinin frekansı kontrol bireylerde, hasta bireylere göre anlamlı düzeyde ($p=0.014$) daha yüksek bulundu. Bu sonuca göre -29GG-G919A-G2039A haplotipinin kadın infertilitesine karşı koruyucu olabileceği düşünülmektedir. Ancak daha geniş katılımlı çalışmalar ile bu verinin desteklenmesi gerekmektedir.

4.3. C566T Mutasyonu

FSHR gen sekansında bulunan mutasyonlar FSHR protein yapısındaki amino asitlerde önemli değişikliklere yol açabileceği, FSHR gen mutasyonlarının hücre yüzeyinde reseptör ekspresyonu, FSH bağlanma kabiliyeti ve FSH sinyal transdüksiyonu ile ilişkili olabileceği üzerinde durulmaktadır (Lussiana ve ark., 2008).

FSHR' nin inaktive edici mutasyonu, proteinin ekstraselüler ligand bağlanma bölgesinde bulunmuştur. Ekzon 7' de bir C566T transisyonu 189. rezidüde Ala' nin Val' ne substitüsyonuna neden olur (Tapanainen, 1998).

FSHR genindeki Ala 189 Val mutasyonunun homozigot olduğu kadınlarda foliküler olgunlaşmanın durmasıyla hipergonadotropik ovaryan yetmezliğin geliştiği, mutasyonun heterozigot olduğu durumlarda sekonder amenorenin gelişip, FSHR aktivitesinin büyük ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Lussiana ve ark, 2008).

Ala189Val mutasyonuna sahip kadınların fenotipi, FSHR' nün kısmen inaktif formlarını eksprese eden kadınlardan daha ciddidir (Ranniko ve ark., 2002).

Mutant Ala 189 Val varyant kurucu etkisinden dolayı kuzey doğu Avrupa'da nadir değildir (Lussiana ve ark, 2008).

C566T (Ala189Val) inaktive edici mutasyonu Brezilya ve Japon populasyonlarında yapılan çalışmalarda görülmemiştir. Yunan populasyonunda da 33 POF, ovulasyon indüksiyonuna zayıf cevap veren 8 kadın ve 20 kontrolle yapılan çalışmada hastaların hiç birinde homozigot veya heterozigot mutasyon saptanmamıştır (Loutradis ve ark, 2006). Hint populasyonunda 40 POF ve 50 sağlıklı kadınla yapılan çalışmada da bu mutasyona rastlanmamıştır (Prakash ve ark., 2009).

Kohek ve arkadaşlarının Brezilya'da 15 prematur ovaryan yetmezliği olan ve 42 normal fertil kontrolle yaptıkları çalışmada mutasyon saptanmamıştır (Kohek ve ark., 1998).

Finlandiya, İsviçre, Danimarka ve Singapur'un Çin populasyonlarında rutin yeni doğan görüntüleme kartlarından sağlanan toplam 4981 örnekle yapılan çalışmalarda Finlandiya'da 1976 örnekte C566T mutasyonunun görülme frekansı %0.96 iken, İsviçrede 1162 örnekte sadece 1 tane mutasyon taşıyıcısı saptanmış, Danimarka (1094 örnek) ve Singapur (540 örnek) populasyonlarında mutasyon saptanmamıştır (Jiang ve ark, 1998).

Biz de 50 infertil ve 50 fertil kontrol bireyle yaptığımız çalışmamızda literatürdeki diğer birçok toplumla uyumlu olarak homozigot ya da heterozigot C566T inaktive edici mutasyonunu saptamadık. Bu mutasyon Türk kadın popülasyonunda ilk kez yaptığımız çalışmada bakılmış olup, sonuçlarımız bu yönüyle de önem taşımaktadır.

Çalışmamızın sonucunda,

- FSHR’de meydana gelen inaktive edici mutasyon ve FSHR polimorfizmleri ile serum FSH seviyeleri arasında bir ilişki Türk popülasyonunda saptanmadı.
- -29GG-G919A-G2039A haplotipinin frekansı, kontrol fertil bireylerde istatistiksel anlamlı ($p=0.014$) olarak yüksek bulunması nedeniyle, bu haplotipin kadın infertilitesine karşı koruyucu bir etkisi olabileceği sonucuna varılmıştır.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında,

- -29 G/A genotipi ile infertilite arasında bir ilişki saptanmadı.
- Ala307Thr polimorfizmleri ile infertilite arasında bir ilişki saptanmadı.
- Ser680Asn polimorfizmleri ile infertilite arasında bir ilişki saptanmadı.
- Çalışmamızda 919.pozisyonda GG genotipine sahip hasta bireylerin FSH seviyeleri 6.9 IU/ml, GA genotipine sahip hasta bireylerin FSH seviyeleri 7 IU/ml, AA genotipine sahip hasta bireylerin FSH seviyeleri 7.5 IU/ml'tir. Sonuçlarımıza göre 919G/A polimorfizmi genotipine göre FSH değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,360$, $p>0.05$).
- 2039.pozisyonda GG genotipine sahip hasta bireylerin FSH seviyeleri 7.5 IU/ml, GA genotipine sahip hasta bireylerin FSH seviyeleri 6.5 IU/ml, AA genotipine sahip hasta bireylerin FSH seviyeleri 6.6 IU/ml'dır. Sonuçlarımıza göre 2039G/A polimorfizmi genotipine göre FSH değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,260$, $p>0.05$).
- Çalışılan bireylerde Ala189Val mutasyonu saptanmadı. Türk toplumunda bu mutasyonun çalışıldığı ilk çalışma olup, sonuçlar bu yönüyle de ele alınmalıdır.
- FSHR'nün -29, 307 ve 680 olarak üç bölgeyi içeren haplotip analizinde ise -29GG-G919A-G2039A haplotipinin frekansı kontrol fertil bireylerde hasta bireylere göre anlamlı düzeyde ($p=0.014$) daha yüksek bulundu. Bu veriye göre -29GG-G919A-G2039A haplotipinin kadın fertilitésinin korunmasında önemli olabileceği düşünüldü.

Son yıllarda yapılan polimorfizm çalışmalarının bazılarında TNP'lerinin her birinin ayrı ayrı öneminden çok birden fazla TNP kombinasyonu söz konusu olduğunda bu haplotipi taşıyanlarda hastalıklara yatkınlık veya hastalıklardan korunmak ile ilgili fenotipik etkinin en belirgin düzeye ulaştığı vurgulanmaktadır.

Bu tez çalışması bilgilerimize göre, Türk toplumundaki kadınlarda FSHR polimorfizmlerinin ve literatürde de FSHR polimorfizmi ile ilgili haplotip analizlerinin fertilite üzerindeki etkisini inceleyen ilk çalışma olması bakımından önemli bir çalışma olup, bu çalışmada Türk toplumundaki kadınlarda FSH reseptöründe meydana gelen polimorfizmler ve mutasyonuna ait genotip sonuçları elde edildi. Bu verilere göre FSHR'ü ile ilgili bakılan TNP'lerin herbiri ve Ala189Val mutasyonu ile infertilite arasında bir ilişki saptanmamış olmasına karşın, -29GG-G919A-G2039A haplotipinin fertilitenin korunmasında önemli olabileceği gözlemlendi.

Hasta ve kontrol birey sayısı arttırılarak çalışmaya devam edilmesi, ve FSH tedavisindeki yanıtlarla bu TNP'lerin arasındaki ilişkinin de çalışmaya dahil edilmesi, ayrıca aynı TNP'lerin fertilite üzerine etkilerinin Türk toplumunda erkeklerde de çalışılması planlanmaktadır.

ÖZET

Türk Toplumundaki Kadınlarda FSHR Polimorfizmleri ve C566T Mutasyonunun Fertilite Üzerine Etkisinin Analizi

Gelişmekte olan ülkelerde en önemli üreme sağlığı problemlerinden bir tanesi infertilitedir. Erkek ve kadınlarda reproduktif fonksiyon FSH (folikül stimüle edici hormon) tarafından düzenlenmektedir. FSH, kadınlarda folikül gelişiminin uyarılması ve granüloza hücre proliferasyonundan sorumludur. FSH, ovaryumda granüloza hücrelerinin yüzeyinde bulunan spesifik reseptörüne (FSHR) bağlanarak görev yapar. FSHR geninde 731 tek nükleotid polimorfizmi (TNP) bulunmaktadır. Önceki çalışmalar 10. ekzondaki polimorfizmlerin reseptör proteinini ve üremeye yardımcı teknikler ile tedavi olan kadınlarda FSH indüksiyonuna karşı yumurtalığın sensitivitesini etkilediğini göstermektedir. Bu çalışmada FSHR geninin -29. pozisyonundaki, 10. ekzonun 307 ve 680. pozisyonlarındaki polimorfizmler ile C566T mutasyonunun frekanslarının, fertil ve infertil Türk kadınlarında PZR-RFLP yöntemi kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda FSH reseptör polimorfizmleri ve mutasyonunun, FSH seviyeleri ve infertilite ile arasında bir ilişki saptanmamıştır; ancak sonuçlarımız, -29GG-G919A-G2039A haplotipinin fertilitenin korunmasında önemli olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: FSH Reseptör, mutasyon, PCR, polimorfizm, RFLP

SUMMARY

Analysis of The Effects on Fertility of FSHR Polymorphisms and C566T Mutation in Women of Turkish Population

One of the most important reproductive health problems in developing countries is infertility. Reproductive function in both female and male is regulated by FSH (follicle stimulating hormone). In women FSH is responsible for follicular growth and proliferation of granulosa cells. FSH action is accomplished by binding to a specific receptor (FSHR) that is located on the granulosa cells in the ovary. FSHR gene includes 731 single-nucleotide polymorphisms. Previous studies showed that the polymorphism in exon 10 of the FSH receptor gene influences the receptor protein and seems to affect ovarian sensitivity to FSH induction in women undergoing assisted reproductive techniques. In the present study the frequencies of polymorphisms (-29, 307 and 680) and mutation (C566T) of FSH receptor gene were aimed to examine by using PCR-RFLP method in fertile and infertile Turkish women. In our study, it wasn't found any relationship between FSHR polymorphisms and mutation with FSH levels and infertility, but our results showed that -29GG-G919A-G2039A haplotype should be considered to be important on fertility status.

Key Words: FSH Receptor, mutation, PCR, polymorphism, RFLP

KAYNAKLAR

- ACHREKAR SK., MODI DN., DESAI SK., MANGOLI VS., MANGOLI RV., MAHALE SD. (2009) Poor ovarian response to gonadotrophin stimulation is associated with FSH receptor polymorphism. Reprod Biomed Online, **18**: 509-15.
- ACHREKAR SK, MODI DN, DESAI SK, MANGOLI VS, MANGOLI RV, MAHALE SD (2009) Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (Thr307Ala) is associated with variable ovarian response and ovarian hyperstimulation syndrome in Indian women. Fertil Steril, **91**:432-9
- ACHREKAR SK., MODI DN., MEHERJI PK., PATEL ZM., MAHALE SD. (2010) Follicle stimulating hormone receptor gene variants in women with primary and secondary amenorrhea. J Assist Reprod Genet, **27**: 317-26.
- AHDA Y, GROMOLL J, WUNSCH A, ASATIANI K, ZITZMANN M, NIESCHLAG E, SIMONI M. (2005) Follicle-stimulating hormone receptor gene haplotype distribution in normozoospermic and azoospermic men. J Androl, **26**:494-9.
- ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. (2002) Molecular Biology of the Cell 4th Ed, p.: 858
- BUFFET N. C and BOUCHARD P. (2001) The Neuroendocrine Regulation Of The Human Ovarian. Cycle Chronobiol Int, **18**: 893-919.
- BÜKÜLMEZ O.,ARICI A., (1996) Üreme Hormonlarının Biyosentezi, İntrasellüler Etki Mekanizma ve Metabolizmaları Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi (Editörler: Prof. Dr. Hüsnü A. Kışnişçi, Prof. Dr. Eflatun Gökşin, Prof. Dr. Lütfü Sabri Önderoğlu, Prof. Dr. Tekin Durukan, Prof. Dr. Kemal Üstay, Prof. Dr. Ali Ayhan, Timur Gürkan) Güneş Tıp Kitabevi, s.: 1109
- CALTABIANO G., CAMPILLO M., DE LEENER A., SMITS G., VASSART G., COSTAGLIOLA S., PARDO L. (2008) The specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors.Cell Mol Life Sci, **65**: 2484-92.
- CHEDRESE, P J. (2009) Reproductive Endocrinology: A Molecular Approach 1 st Edition
- CONN PM, ULLOA-AGUIRRE A., ITO J., JANOVICK JA. (2007) G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo. Pharmacol Rev, **59**: 225-50.
- CONWAY GS, CONWAY E, WALKER C, HOPPNER W, GROMOLL J, SIMONI M. (1999) Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. Clin Endocrinol (Oxf), **51**: 97-9.
- DONG C., FİLİPEANU CM., DUVERNAY MT., WU G. (2007) Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. Biochim Biophys Acta, **1768**: 853-70.
- DU J, ZHANG W, GUO L, ZHANG Z, SHI H, WANG J, ZHANG H, GAO L, FENG G, HE L. (2010) Two FSHR variants, haplotypes and meta-analysis in Chinese women with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. Mol Genet Metab, **100**: 292-5.
- FALCONER H., ANDERSSON E., AANESSEN A., FRIED G.(2005) Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in a population of infertile women. Acta Obstet Gynecol Scand, **84**: 806-811.
- FLÜGGE J, KRUSEKOPF S, GOLDAMMER M, OSSWALD E, TERHALLE W, MALZAHN U, ROOTS I.(2007) Vitamin D receptor haplotypes protect against development of colorectal cancer. Eur J Clin Pharmacol, **63**:997-1005
- GHADAMI M., SALAMA SA., KHATOON N., CHILVERS R., NAGAMANI M., CHEDRESE PJ., AL-HENDY A. (2008) Toward gene therapy of primary ovarian failure:

- adenovirus expressing human FSH receptor corrects the Finnish C566T mutation. Mol Hum Reprod, **14**:9-15.
- GREB RR., GRIESHABER K., GROMOLL J., SONNTAG B., NIESCHLAG E., KIESEL L., SIMONI M. (2005) A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab, **90**: 4866-72.
- GROMOLL J, SIMONI M. (2005) Genetic complexity of FSH receptor function. Trends Endocrinol Metab, **16**: 368-73.
- HECKERT LL, GRISWOLD MD. (2002) The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. Recent Prog Horm Res, **57**: 129-48.
- JIANG M, AITTOMÄKI K, NILSSON C, PAKARINEN P, IITIÄ A, TORRESANI T, SIMONSEN H, GOH V, PETTERSSON K, DE LA CHAPELLE A, HUHTANIEMI I. (1998) The frequency of an inactivating point mutation (566C-->T) of the human follicle-stimulating hormone receptor gene in four populations using allele-specific hybridization and time-resolved fluorometry. J Clin Endocrinol Metab, **83**: 4338-43.
- JI TH, GROSSMANN M, JI L. (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. J Biol Chem, **273**: 17299-302.
- JUNQUEIRA L C, CARNEIRO J. (2006) Temel Histoloji (Çeviri editörü: Prof.Dr. Yener Aytekin ve Doç. Dr. Seyhun Solakoğlu) Nobel Tıp Kitabevi, s.:450
- KOHEK MB, BATISTA MC, RUSSELL AJ, VASS K, GIACAGLIA LR, MENDONCA BB, LATRONICO AC. (1998) No evidence of the inactivating mutation (C566T) in the follicle-stimulating hormone receptor gene in Brazilian women with premature ovarian failure. Fertil Steril, **70**: 565-7.
- KUIJPER EA, BLANKENSTEIN MA, LUTTIKHOF LJ, ROEK SJ, OVERBEEK A, HOMPEES PG, TWISK JW, LAMBALK CB. (2010) Frequency distribution of polymorphisms in the FSH receptor gene in infertility patients of different ethnicity. Reprod Biomed Online, **20**: 588-593.
- KUTLUKHAN, O. (1996) Menstrual Döngü (Siklus) ve Nöroendokrin Kontrolü Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi (Editörler: Prof. Dr. Hüsnü A. Kişnişçi, Prof. Dr. Eflatun Gökşin, Prof. Dr. Lütfü Sabri Önderoğlu, Prof. Dr. Tekin Durukan, Prof. Dr. Kemal Üstay, Prof. Dr. Ali Ayhan, Timur Gürkan) Güneş Tıp Kitabevi, s.:1119
- LAVEN JS, MULDER AG, SURYANDARI DA, GROMOLL J, NIESCHLAG E, FAUSER BC, SIMONI M. (2003) Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in women with normogonadotropic anovulatory infertility. Fertil Steril, **80**: 986-92.
- LEE YL, WANG ST, TSAI CH, GUO YL (2009) Associations of beta2-adrenergic receptor genotypes and haplotypes with wheezing illness in Taiwanese schoolchildren. Allergy, **64**:1451-7.
- LEND AK, BELOUSOVA A, HALLER-KIKKATALO K, PUNAB M, POOLAMETS O, PETERS M, SALUMETS A. (2010). Follicle-stimulating hormone receptor gene haplotypes and male infertility in estonian population and meta-analysis. Syst Biol Reprod Med, **56**: 84-90
- LIVSHYTS G, PODLESNAJA S, KRAVCHENKO S, SUDOMA I, LIVSHITS L. (2009) A distribution of two SNPs in exon 10 of the FSHR gene among the women with a diminished ovarian reserve in Ukraine. J Assist Reprod Genet, **26**: 29-34.
- LOUTRADIS D, PATSOULA E, STEFANIDIS K, DRAKAKIS P, ANTONAKIS G, BLETSA R, ANTSAKLIS A, MICHALAS S. (2006) Follicle-stimulating hormone receptor gene mutations are not evident in Greek women with premature ovarian failure and poor responders. Gynecol Obstet Invest, **61**: 56-60.
- LUSSIANA C, GUANI B, MARI C, RESTAGNO G, MASSOBRIO M, REVELLI A. (2008) Mutations and Polymorphisms of the FSH Receptor (FSHR) Gene Clinical Implications in Female Fecundity and Molecular Biology of FSHR Protein and Gene Obstet Gynecol Surv, **63**: 785-95.

- PRAKASH GJ, KANTH VV, SHELLING AN, ROZATI R, SUJATHA M. (2009). Absence of 566C>T mutation in exon 7 of the FSHR gene in Indian women with premature ovarian failure. Int J Gynaecol Obstet **105**: 265-6.
- PEREZ MAYORGA M, GROMOLL J, BEHRE HM, GASSNER C, NIESCHLAG E, SIMONI M. (2000) Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. J Clin Endocrinol Metab. **85**:3365-9
- PENGO M, FERLIN A, ARREDI B, GANZ F, SELICE R, GAROLLA A, FORESTA C. (2006) FSH receptor gene polymorphisms in fertile and infertile Italian men. Reprod Biomed Online, **13**: 795-800.
- RANNIKKO A, PAKARINEN P, MANNA PR, BEAU I, MISRAHI M, AITTOMÄKI K, HUHTANIEMI I. (2002) Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation. Mol Hum Reprod, **8**:311-7.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. (1982) Molecular cloning a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor Laboratory. Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SIVASLIOĞLU A A (2004) Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi Tusem Tıbbi Yayıncılık, s.: 51
- SIMONI M, GROMOLL J, NIESCHLAG E. (1997) The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology, Endocr Rev, **18**: 739-73.
- SIMONI M, NIESCHLAG E, GROMOLL J. (2002) Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. Hum Reprod Update, **8**: 413-21.
- SIMONI M, TEMPFER CB, DESTENAVES B, FAUSER BC. (2008) Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: Polycystic ovary syndrome and ovarian response. Hum Reprod Update, **14**: 459–484.
- SPEROFF L, FRITZ MA. (2005) ‘Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility’ 7th Ed, p.: 185-215
- STRAUSS III JF. , BARBIERI RL. (2006) ‘YEN ve JAFFE, Üreme Endokrinolojisi , Fizyoloji, Patofizyoloji ve Klinik Muayene’ 5. Baskı. (Çeviri editörü: Prof. Dr. Serdar GÜNALP) Güneş Tıp Kitabevi, Bölüm 7
- SUDO S, KUDO M, WADA S, SATO O, HSUEH AJ, FUJIMOTO S. (2002) Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. Mol Hum Reprod, **8**: 893-9.
- SUNDBLAD V, CHIAUZZI VA, ESCOBAR ME, DAİN L, CHARREAU EH. (2004) Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF). Mol Cell Endocrinol. **222**:53-9.
- TAN EK, CHAN DK, NG PW, WOO J, TEO YY, TANG K, WONG LP, CHONG SS, TAN C, SHEN H, ZHAO Y, LEE CG. (2005) Effect of MDR1 haplotype on risk of Parkinson disease. Arch Neurol, **62**(3):460-4.
- TAPANAINEN JS, VASKIVUO T, AITTOMÄKI K, HUHTANIEMI IT. (1998) Inactivating FSH receptor mutations and gonadal dysfunction Molecular and Cellular Endocrinology, **145**: 129–135
- THEMMEN APN, HUHTANIEMI IT. (2000) Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. Endocr Rev, **21**: 551-83.
- ULLOA-AGUIRRE A, TIMOSSİ C. (1998) Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. Hum Reprod Update, **4**: 260-83.

- ULLOA-AGUIRRE A, STANIŠLAUS D, JANOVICK JA, CONN PM. (1999) Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors. Arch Med Res, **30**: 420-35.
- ULLOA-AGUIRRE A, ZARÍNÁN T, PASAPERA AM, CASAS-GONZÁLEZ P, DÍAS JA. (2007) Multiple facets of follicle-stimulating hormone receptor function. Endocrine, **32**: 251-63.
- UNSAL T, KONAC E, YESİLKAYA E, YILMAZ A, BİDECİ A, ILKE ONEN H, CİNAZ P, MENEVSE A. (2009) Genetic polymorphisms of FSHR, CYP17, CYP11A1, CAPN10, INSR, SERPINE1 genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome. J Assist Reprod Genet, **26**: 205-16
- VELASQUEZ JL, LIPKIN SM. (2007) Genetic testing to identify high-risk populations for chemoprevention studies. Cancer Biomark, **3**: 163-8.
- WUNSCH A, YUNI A, BANAZ-YAŞAR F, SONNTAG B, NIESCHLAG E, SIMONI M, GROMOLL J. (2005) Single-nucleotide polymorphisms in the promoter region influence the expression of the human folliclestimulating hormone receptor Fertil Steril, **84**: 446-53.
- WUNSCH A, SONNTAG B, SIMONI M. (2007) Polymorphism of the FSH receptor and ovarian response to FSH. Ann Endocrinol (Paris), **68**: 160-6
- YI CS, SONG YS, RYU KS, SOHN J, JI I, JI TH. (2002) Common and differential mechanisms of gonadotropin receptors Cell Mol Life Sci, **59**: 932-40.

EKLER

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Bu form katılmanız önerilen araştırma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek üzere hazırlanmış olup; araştırmaya katılıp katılmama konusunda karar vermenizin kolaylaştırılması hedeflenmiştir.

Araştırmanın Adı: Kadınlarda FSHR polimorfizmleri ve C566T mutasyonunun fertilite üzerine etkisinin analizi

Araştırmanın Amacı: Hipofiz hormonu olan folikül stimüle edici hormon (FSH) ergenlikte yumurtalığın gelişmesi, olgunlaşması ve özellikle üreme yaşamı süresince yumurta üretimi için gereklidir. FSH, öncü yumurta hücrelerinden daha olgun yumurta hücreleri oluşumu için gereklidir. FSH yokluğu, FSH fonksiyonuna duyarlı olan veya etkilerini bu yolla arttıran bölgesel faktörlerin yokluğuna ve yumurta hücrelerinde programlı hücre ölümünün başlatılmasına neden olur. Lüteinleştirici hormon (LH) ile birlikte FSH hipofiz bezi tarafından üretilir ve salgılanır. FSH yumurtalıklarda bulunan kendine özgü almacına bağlanarak görev yapar. FSH’ ın üremedeki önemli rolüne bağlı olarak, FSH almacında meydana gelen değişiklikler yumurta üretimi ile FSH’ a duyarlılığı etkiler ve kısırlıkla sonuçlanabilir. Bu çalışmada, 2p21 kromozom bölgesinde bulunan FSH almaç geninde meydana gelen bazı genetik değişiklikler araştırılacaktır. Çalışma kapsamında, sizinle birlikte 100 çocuğu olmamış ve 100 adet çocuk doğurmuş sağlıklı birey ile çalışılacaktır.

Sizden bir defaya mahsus, kol damarınızdan yaklaşık 5 ml (4 çay kaşığı) kan örneği istenmektedir. Kan alınımı, kolunuzdan ve sizi incitmeden gerçekleştirilecektir. Ancak kullanılan enjektör nedeniyle hafif derecede bir ağrı hissedebilirsiniz ve kolunuzda enjektörün temas ettiği bölgede bölgesel bir morarma görülebilir. Kan alınırken, sağlık ekibi oluşabilecek sorunlara müdahale için yanınızda bulunacaktır. Bu kanlardan genomik DNA elde edilecektir. Bu DNA’lardan PZR - RFLP

(Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi) yöntemi ile mutasyon ve polimorfizm sonuçları elde edilecektir.

Eğer katılmayı kabul ederseniz, çalışmaya katılma süreniz sadece kan verme işleminin alacağı süre kadardır. Size her hangi bir ilaç verilmeyecek ve bu durum yaşamınızı etkilemeyecektir, ayrıca tedavi görüyorsanız tedavinizde değişiklik yapılmayacaktır. Çalışmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmadan istediğiniz zaman çıkabilirsiniz, ayrıca teknik nedenlerden dolayı araştırmacı tarafından çalışmadan çıkarılabilirsiniz. Bu çalışma size ve sosyal güvencenizi sağlayan kuruma ekonomik açıdan mali bir yük getirmeyecektir.

Bu bilimsel amaçlı çalışma Yrd. Doç Dr. Sena Aydos danışmanlığında Bio. Seda Nermin Ilgaz tarafından yürütülecektir. Çalışma süresince herhangi soru veya sorunuz olduğunda kendilerine Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Morfoloji Binası Kat:2'den ulaşabilirsiniz. Bu yazının bir kopyası da size verilecektir.

Yardımlarınız için çok teşekkür ederiz.

Benyukarıdaki açıklamaları okudum. Okuduğum bilgiler bana sözlü olarak da iletildi. Bu çalışmaya gönüllü olarak katılmak istiyorum.

Bu bilgiler ışığında elde edilen DNA'mın;

- ☐ Başka amaçla kullanılmaması
- ☐ Kimliğimin gizli tutularak bilimsel amaçlı diğer çalışmalarda da kullanılabilmesi koşulu ile kullanılmasına izin veriyorum.

Hasta Adı- Soyadı	İmza	Tarih
Araştırmacı Dr. Adı Soyadı	İmza	Tarih
Tanıklık eden kurum yetkilisi Adı-Soyadı	İmza	Tarih

EK-2

**SAĞLIKLI KONTROL GRUBU İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ
OLUR FORMU**

Bu form katılmanız önerilen araştırma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek üzere hazırlanmış olup; araştırmaya katılıp katılmama konusunda karar vermenizin kolaylaştırılması hedeflenmiştir.

Araştırmanın Adı: Kadınlarda FSHR polimorfizmleri ve C566T mutasyonunun fertilite üzerine etkisinin analizi

Araştırmanın Amacı: Hipofiz hormonu olan folikül stimüle edici hormon (FSH) ergenlikte yumurtalığın gelişmesi, olgunlaşması ve özellikle üreme yaşamı süresince yumurta üretimi için gereklidir. FSH, öncü yumurta hücrelerinden daha olgun yumurta hücreleri oluşumu için gereklidir. FSH yokluğu, FSH fonksiyonuna duyarlı olan veya etkilerini bu yolla arttıran bölgesel faktörlerin yokluğuna ve yumurta hücrelerinde programlı hücre ölümünün başlatılmasına neden olur. Lüteinleştirici hormon (LH) ile birlikte FSH hipofiz bezi tarafından üretilir ve salgılanır. FSH yumurtalıklarda bulunan kendine özgü almacına bağlanarak görev yapar. FSH’ ın üremedeki önemli rolüne bağlı olarak, FSH almacında meydana gelen değişiklikler yumurta üretimi ile FSH’ a duyarlılığı etkiler ve kısırlıkla sonuçlanabilir. Bu çalışmada, 2p21 kromozom bölgesinde bulunan FSH almaç geninde meydana gelen bazı genetik değişiklikler araştırılacaktır. Çalışma kapsamında, sizinle birlikte 100 çocuğu olmamış ve 100 adet çocuk doğurmuş sağlıklı birey ile çalışılacaktır.

Sizden bir defaya mahsus, kol damarınızdan yaklaşık 5 ml (4 çay kaşığı) kan örneği istenmektedir. Kan alınımı, kolunuzdan ve sizi incitmeden gerçekleştirilecektir. Ancak kullanılan enjektör nedeniyle hafif derecede bir ağrı hissedebilirsiniz ve kolunuzda enjektörün temas ettiği bölgede bölgesel bir morarma görülebilir. Kan alınırken, sağlık ekibi oluşabilecek sorunlara müdahale için yanınızda bulunacaktır. Bu kanlardan genomik DNA elde edilecektir. Bu DNA’lardan PZR – RFLP (Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi) yöntemi ile mutasyon ve polimorfizm sonuçları elde edilecektir.

Eğer katılmayı kabul ederseniz, çalışmaya katılma süreniz sadece kan verme işleminin alacağı süre kadardır. Size her hangi bir ilaç verilmeyecek ve bu durum yaşamınızı etkilemeyecektir, ayrıca tedavi görüyorsanız tedavinizde değişiklik yapılmayacaktır.

Çalışmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmadan istediğiniz zaman çıkabilirsiniz, ayrıca teknik nedenlerden dolayı araştırmacı tarafından çalışmadan çıkarılabiliyorsunuz. Bu çalışma size ve sosyal güvencenizi sağlayan kuruma ekonomik açıdan mali bir yük getirmeyecektir. Sizden elde ettiğimiz DNA' lar saklanacak ve başka bilimsel çalışmalarda kullanılabilinecektir.

Bu bilimsel amaçlı çalışma Yrd. Doç Dr. Sena Aydos danışmanlığında Bio. Nermin Seda Ilgaz tarafından yürütülecektir. Çalışma süresince herhangi soru veya sorunuz olduğunda kendilerine Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Morfoloji Binası Kat:2'den ulaşabilirsiniz. Bu yazının bir kopyası da size verilecektir.

Yardımlarınız için çok teşekkür ederiz.

Benyukarıdaki açıklamaları okudum. Okuduğum bilgiler bana sözlü olarak da iletildi. Bu çalışmaya gönüllü olarak katılmak istiyorum.

Bu bilgiler ışığında elde edilen DNA'mın;

- ☐ Başka amaçla kullanılmaması
- ☐ Kimliğimin gizli tutularak bilimsel amaçlı diğer çalışmalarda da kullanılabilmesi koşulu ile kullanılmasına izin veriyorum.

Hasta Adı- Soyadı	İmza	Tarih
Araştırmacı Dr. Adı Soyadı	İmza	Tarih
Tanıklık eden kurum yetkilisi Adı-Soyadı	İmza	Tarih

EK-3

ETİK KURUL ONAYI

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ANKARA UNIVERSITY ANKARA-TÜRKİYE ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI				
BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU			
	PROTOKOL ADI	FSH hormonunun reseptör geninde meydana gelen A919G (Thr307Ala), G2039A (Ser680Asn), G29A tek nükleotid değişimlerinin ve C566T (Ala189Val) inaktive edici mutasyonunun fertilite ile ilişkisi		
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof.Dr.Hakan Şatiroğlu		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı		
	DESTEKLEYİCİ FİRMA			
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BİLGİLER	Belge Adı	Değişiklik No. / Tarihi	Dili	
	PROTOKOL			
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ			
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU			
	OLGU RAPOR FORMU			
ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KLAVUZU			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 154-4948	Tarih: 29 Haziran 2009		
	Araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve Yönergenin 11/h maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere bütçesi temin edildiği takdirde laboratuvar çalışmasının fakültemizde yürütülmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oybirliği ile karar verildi.			
ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ayhan Başkan	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Efser Kerimoğlu Başkan Yardımcısı	Çocuk Psikiyatrisi	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Özden Palaoğlu Sekreter	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	
 Hasan TUNA 2010 A. Ü. Tıp Fakültesi Doküman ve Bilgi İşlem Birimi ASLI GİBİDİR				

Prof. Dr. Handan Onur Üye	Tıbbi Onkoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	Handan
Prof. Dr. Ajlan Tükün Üye	Tıbbi Genetik	Ankara Tıp Fakültesi	K	Ajlan
Prof. Dr. Esra Erden Üye	Patoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Esra
Prof. Dr. Aydan İkinciogulları Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Tıp Fakültesi	K	Aydan
Prof. Dr. Ethem Geçim Üye	Genel Cerrahi	Ankara Tıp Fakültesi	E	Ethem
Prof. Dr. Erdal Onar Üye	Hukuk	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E	Erdal
Prof. Dr. Yasemin Oğuz Üye	Deontoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Yasemin
Prof. Dr. Bülent Gümüşel Üye	Farmakoloji-Eczacı	Hacettepe Üniv. Eczacılık Fakültesi	E	Bülent
Doç. Dr. Aslıhan Avcı Üye	Biyokimya	Ankara Tıp Fakültesi	K	Aslıhan
Gülsüm Aslan	Sağlık Mesleği Dışı	Emekli	K	Gülsüm

Hasan ÜNA
07.07.2010

ASLI GİBİDİR

IV. Üye Oldugu Bilimsel Kuruluşlar

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği

Moleküler Kanser Araştırma Derneği (MOKAD)

Avrupa Kanser Araştırma Derneği (EACR)

V. Bilimsel İlgi Alanları

Poster Sunumları

Aydos S, Taspinar M, Sakiragaoglu O, Ozkan T, Ilgaz S, Gokce I, Baltaci S, Sunguroglu A. PON1 192 Q/R Polymorphism and Prostate Cancer. Mediterranean Medical Genetics Meeting 2009, 28 June-1 July 2009 Ankara, Turkey

Sena Aydos, Mehmet Taşpınar, Seda Ilgaz, Sertaç Batıoğlu, Asuman Sunguroğlu. Tedaviye Dirençli Primer İnfertilite Olgusunda FSHR -29 G/A Polimorfizmi. 4.Ege Genetik Sempozyumu 21.Kasım 2008

VI. Bilimsel Etkinlikleri

Katıldığı Kongre ve Seminerler

30 Nisan 2009 2. Ankara Tıp Biyokimya Günü
11-12 Mayıs 2009 Horizons in Molecular Biology and Genetics II
13 Nisan 2010 3. Ankara Tıp Biyokimya Günü
25-26 Haziran 2010 I. Tüba Kök Hücre Kursu
V.Kök Hücre Sempozyumu

Verdiği Seminerler

02.05.2008 Kök Hücrenin Tedavide Kullanım Alanları
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D
08.05.2009 Şaperonlar
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D

Literatür Sunumları

- 2008 Inhibition of Cell Growth and Induction of Apoptosis via Inactivation of NF- κ B by a Sulfurcompound Isolated From Garlic in Human ColonCancer Cells

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D

- 2009 Toward gene therapy of primary ovarian failure: adenovirus expressing human FSH receptor corrects the Finnish C566T mutation

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D

- 2010 Androgen, progesterone, and FSH receptor polymorphisms in ovarian cancer risk and outcome

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D

- 2010 The haplotype of two FSHR polymorphisms in ovarian cancer— A potential role of ethnology in risk modification

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D

- 2010 Single nucleotide polymorphisms of follicle-stimulating hormone receptor are associated with ovarian cancer susceptibility

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D