

Erkek infertilitesinde metiyonin sentaz A2756G ve metiyonin sentaz redüktaz A66G gen polimorfizmlerinin etkisi

Effect of methionine synthase A2756G and methionine synthase reductase A66G gene polymorphisms in male infertility

Ali Şahin Küçükaslan¹, Raşit Altıntaş², Vildan Bozok Çetintaş¹, Aslı Tetik¹, Murat Ulukuş³,
Bülent Semerci², Zuhal Eroğlu¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, İzmir

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İzmir

Özet

Amaç: Bu çalışmada metiyonin sentaz (MTR) ve metiyonin sentaz redüktaz (MTRR) A2756G ve A66G gen polimorfizmlerinin infertilite ile ilişkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Gereç ve yöntem: Bu amaçla 66 azospermi ve 51 oligozoospermi olmak üzere toplam 117 infertilite olgusu ile 70 sağlıklı bireyin kan örnekleri toplanarak MTR A2756G ve MTRR A66G genotiplendirmeleri yapılmıştır.

Bulgular: Kontrol ve çalışma grubunda MTR A2756G genotipleri sırasıyla %64 AA, %34 AG, %1 GG ve %54 AA, %39 AG, %7 GG olup, G allelinin artışı kontrol grubuna oranla çalışma grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). MTRR A66G genotipleri açısından analiz edildiğinde gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (kontrol ve çalışma grubu için sırasıyla %9 AA, %79 AG, %13 GG ve %4 AA, %73 AG, %23 GG, $p>0.05$).

Sonuç: Erkek infertilitesi gelişiminde MTR A2756G polimorfizminde G allelin sadece hasta grubunda yüksek bulunması daha ileri ve yüksek hasta sayılı çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar sözcükler: Azospermi; erkek infertilitesi; folat metabolizması; metiyonin sentaz redüktaz; oligozoospermi; polimorfizm.

Abstract

Objective: In this study, we investigated whether methionine synthase (MTR) A2756G and methionine synthase reductase (MTRR) A66G gene polymorphisms were related with infertility.

Materials and methods: Blood samples of 117 infertile (66 azoospermia, 51 oligozoospermia) cases and 70 healthy men were collected and genotyped for MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms.

Results: In control and study groups MTR A2756G genotypes were 64% AA, 34% AG, 1% GG and 54% AA, 39% AG, 7% GG, respectively, and the frequency of the G allele in the study group was increased compared to control group ($p<0.05$). MTRR A66G genotypes were 9% AA, 79% AG, 13% GG in control group and 4% AA, 73% AG, 23% GG in control group without statistically significant difference ($p>0.05$).

Conclusion: MTR A2756G gene polymorphism may have an important effect on the evolution of male infertility. Finding of increased G allele frequency of study group will lead to further and larger sample-size studies.

Key words: Azoospermia; folate metabolism; male infertility; methionine synthase reductase; oligozoospermia; polymorphism.

Geliş tarihi (Submitted): 23.05.2010

Düzeltilme sonrası kabul tarihi (Accepted after revision): 25.12.2010

Spermatogenez, birçok genin kontrol ettiği karmaşık bir olaydır.^[1] Moleküler seviyede DNA metilasyonu ve metabolizma seviyesinde folat metabolizması bu karmaşık olayda önemi olan mekanizmalardandır.

Folat; DNA sentezi, metilasyon reaksiyonları ve protein sentezinde önemli işlevleri olan bir moleküldür. Folat döngüsünde yer alan önemli enzimler bulunmaktadır. Bu enzimler arasında,

5-metiltetrahidrofolat-homosistein metiltransferaz (MTR) ve 5-metiltetrahidrofolat-homosistein metiltransferaz redüktaz (MTRR) enzimini kodlayan genlerde görülen bazı polimorfizmlerin, hipometilasyon ve homosistein artışıyla, DNA sentezi ve metilasyonunu etkileyerek mayotik non-disjunction olayına ve buna bağlı olarak da anormal kromozomal segregasyona (ayrılma) neden olduğu ve bu yolla da bazı hastalıkların gelişiminde etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu genlerdeki polimorfizmler, enzimlerin aktivitesinin değişmesine ve bireylerde homosistein düzeylerinin artışına da neden olabilmektedir.

Spermatogenez olayını da metabolizma seviyesinde etkileyen bu enzimlerden MTR, kromozom 1q43'e lokalize olan metiyonin sentaz gen ürünü olup (Gene ID: 4548) kobalamin bağlı, karbon metabolizmasında metiyonin amino asidinin biyosentezinde katalizör rolü oynamaktadır. MTRR enzimi ise kromozom 5p15.3-p15.2'de yerleşmiş olan MTRR gen ürünüdür (Gene ID: 4552).^[2] Bu gen DNA metilasyonunu indirgeyerek fonksiyonel olan metiyonin sentazı oluşturmaktadır.^[3,4]

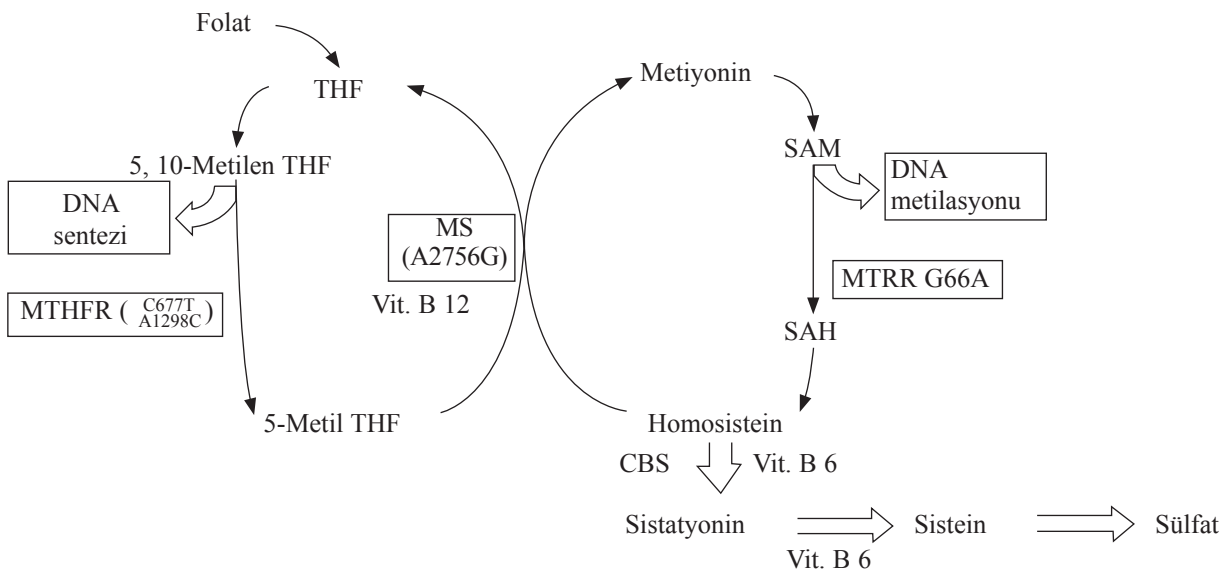
Son zamanlarda yapılan moleküler biyolojik araştırmalar sonucu, MTR genindeki polimorfizmlerden birinde 2756. pozisyonundaki A->G transisyonu ile aspartik asitin glisin aminoasidine dönüştüğü ve bu mutant allel sıklığının yaklaşık 0.15-0.20 oranında

görüldüğü belirlenmiştir.^[5-8] Bu polimorfizmin B12 kofaktörün reaktivasyonu ve metilasyonda rol alan domainde meydana geldiği için enzimin aktivitesini değiştirdiği düşünülmektedir.^[8] MTRR enzimi ise; FMN (*flavin mononucleotide binding*), FAD (*flavin adenine dinucleotide binding*) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (indirgenmiş formu, NADPH) bağlayan bölgeler içeren ferredoksin-nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP⁺) redüktaz grubunun bir üyesidir. Bu enzim metil vericisi olarak S-adenozilmetiyonin'i kullanarak MTR'nin metilasyonunun indirgenmesini katalizleyerek DNA metilasyonuna katılmaktadır (Şekil 1).^[9,10] MTRR; MTR'ı reaktif eden kobalaminin (II) metilasyonunu indirgeyerek metilasyonda rol almaktadır.^[4]

Bu bilgilere dayanarak, bu çalışmamızda folat metabolizmasında önemli görevleri olan MTR ve MTRR enzimlerini kodlayan genlerde en yaygın görülen MTR A2756G ve MTRR A66G gen polimorfizmlerinin erkek infertilitesi üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve yöntem

Çalışmamızda, kontrol grubu 70 sağlıklı erkek bireyden, çalışma grubu ise Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda azospermi tanısı almış 66 erkek olgu ile oligozoospermi tanısı almış



Şekil 1 Folat metabolik yolağı.

51 erkek olgu olmak üzere toplam 187 olgudan oluşturulmuştur. Olguların her birinden EDTA'lı tüplere 3'er mL (2 tüp) kan örneği alınmış ve tıbbi özgeçmişleri ile ilgili sorular sorularak kaydedilmiştir.

Çalışma protokolümüz Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından 04.06.2008 tarihli ve 08-3/9 sayılı karar ile onaylandı.

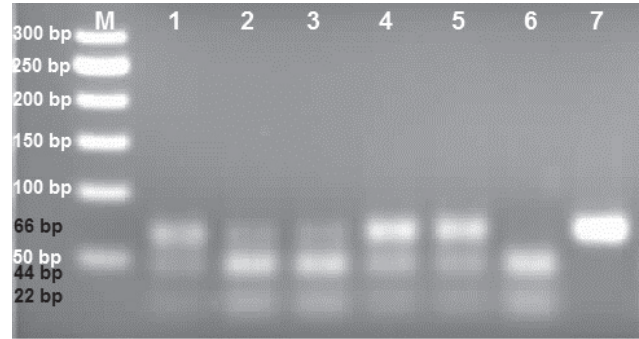
MTR ve MTRR gen polimorfizmlerinin analizi

Çalışmamıza uygun olarak seçilen hasta ve kontrol grubunun periferik kan örneklerinden, *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Applied Science, Almanya) kullanılarak DNA izolasyonları yapılmıştır. MTR A2756G polimorfizmi için; 5'-AGG CAG GAA TTA GCA CAG T-3' ve 5'-GAT CCA AAG CCT TTT ACA CTC-3' primer dizileri kullanılarak toplam 10 µL'lik PCR karışımı, 45 siklus, 95°C 30 sn, 95°C 30 sn, 58°C 10 sn, 72°C 10 sn, 40°C 30 sn tutularak örnekler amplifiye edilmiş, daha sonra PCR ürünleri *BsuRI* (*HaeIII*) restriksiyon enzimi ile kesilerek %3'lük agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 2). MTRR A66G polimorfizmi için ise 5'-GCA AAG GCC ATC GCA GAA GAC AT-3' ve 5'-GTG AAG ATC TGC AGA AAA TCC A-3' primer dizileri kullanılmış, 10µl'lik PCR karışımına 45 siklus 95°C 30 sn, 95°C 5 sn, 53°C 10 sn, 72°C 3 sn, 40°C 30 sn olacak şekilde PCR uygulanmıştır. Oluşan PCR ürünleri *NdeI* restriksiyon enzimi ile kesilerek %6'luk agaroz jel elektroforezinde koşturulmuş ve genotiplendirilmiştir (Şekil 3). Bu polimorfizmlere ait genotipler istatistiksel olarak ki-kare testi ve regresyon analizi yöntemleri kullanılarak incelenmiştir.

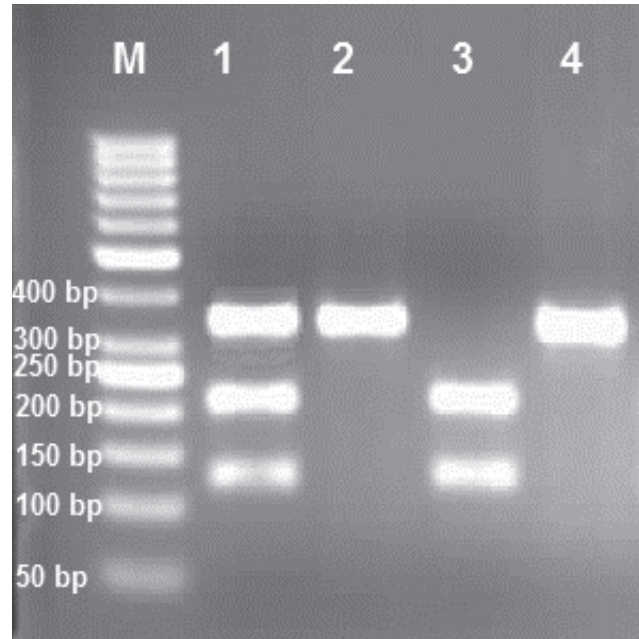
Bulgular

Çalışmamız sonucunda kontrol grubu ve hasta grubuna ait MTR A2756G genotiplendirmelerinde; 70 bireyden oluşan kontrol grubunda, 45 kişinin (%64) yabanıl (AA), 24 kişinin (%34) heterozigot (AG) ve bir kişinin de (%1) mutant (GG) genotipe sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışma grubunda ise, 62 olgunun (%54) yabanıl (AA), 45 olgunun (%39) heterozigot (AG) ve 8 olgunun da (%7) mutant (GG) genotipe sahip olduğu belirlenmiştir. MTR A2756G polimorfizmindeki G allelin artışı kontrol grubuna oranla çalışma grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 1).

MTRR A66G polimorfizmin de ise kontrol grubunda 6 olgunun (%9) yabanıl (AA), 55 olgunun



Şekil 2 MTR A2756G polimorfizmi için yabanıl (1, 3, 4, 5), mutant (2) ve heterozigot (6) genotiplerin RFLP sonrasında %3'lük agaroz jeldeki görüntüleri.



Şekil 3 RFLP sonrasında MTRR G66A polimorfizmi için heterozigot (1) ve yabanıl (2) genotiplerin %6'luk agaroz jeldeki görüntüleri.

(%79) heterozigot (AG) ve 9 olgunun (%13) mutant (GG) genotipe sahip olduğu, çalışma grubunda ise 5 olgunun (%4) yabanıl (AA), 84 olgunun (%73) heterozigot (AG) ve 26 olgunun (%23) mutant (GG) genotipe sahip olduğu gözlenmiştir. Bu verilere bağlı olarak çalışma grubundaki G allelindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$) (Tablo 2).

Ayrıca MTR A2756G ve MTRR A66G polimorfizmleri karşılaştırıldığında iki polimorfizm açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Tablo 1. Kontrol ve çalışma gruplarının MTR A2756G genotip dağılımı [n (%)]

	Kontrol grubu (n=70)	Çalışma grubu (n=115)	OR	%95GA	p değeri
Yabanıl (AA)	45 (%64)	62 (%54)	-	R	>0.05
Heterozigot (AG)	24 (%34)	45 (%39)	1.361	0.727-2.547	>0.05
Mutant (GG)	1 (%1)	8 (%7)	5.806	0.701-48.085	>0.05
A	115 (%40)	169 (%60)	-	R	0.036
G	25 (%29)	61 (%71)	0.673	0.444-1.020	

OR: Odds oranı, GA: Güven aralığı.

Tablo 2. Kontrol ve çalışma gruplarının MTRR A66G genotip dağılımı [n (%)]

	Kontrol grubu (n=70)	Çalışma grubu (n=115)	OR	%95GA	p değeri
Yabanıl (AA)	6 (%9)	5 (%4)	-	R	0.659
Heterozigot (AG)	55 (%79)	84 (%73)	1.833	0.533-6.299	0.169
Mutant (GG)	9 (%13)	26 (%23)	3.467	0.848-14.174	0.336
A	67 (%42)	94 (%58)	-	R	0.084
G	73 (%35)	136 (%65)	0.882	0.728-1.068	0.114

OR: Odds oranı, GA: Güven aralığı.

Tartışma

Son yıllarda genetik araştırmalar sonucunda kromozomal anormalliklerinin, Y-kromozom mikrodelsiyonlarının, translokasyonların, kistik fibroz transmembran konduktans regülatör mutasyonlarının ve ayrıca homosistein veya folat metabolizması enzimlerini kodlayan genlerdeki bazı polimorfizmlerin erkek infertilitesinde etkili olduğu belirtilmektedir.^[6,9,11]

MTRR genindeki A66G polimorfizmi önceleri A->G değişimi olarak adlandırılmış ve AA yabanıl genotip olarak belirlenmişken sonraki çalışmalarda 1000'den fazla sağlıklı kontroldeki yeni veriler temel alındığında G allelinin A'dan daha yaygın olduğu bulunmuş ve AA mutant genotip olarak kabul edilmiştir.^[12] Ancak halen bazı çalışmalarda G allelinin mutant kabul edildiği göze çarpmaktadır.

Batı Avrupa, İtalya ve Hindistan'da çeşitli araştırma grupları yaptıkları araştırmalarda MTHFR polimorfizmi ve erkek infertilitesi arasındaki ilişkiyi incelemişler ve en azından homozigot durumda infertilite için risk faktörü olabileceğini göstermişlerdir.^[13-16] Bu gruplar arasından Batı Avrupa grubunu inceleyen Bezold ve ark.^[13] homozigot MTHFR C677T'nin infertilite için risk faktörü olabileceğini göstermişlerdir.

Lee ve ark.^[10] oligoastenoteratozoospermi (OAT) grubunda sperm parametrelerini incelemişler, MTHFR C677T ve MTRR A66G genotipleri ile sperm sayısı

ve motilite açısından ilişki olduğunu fakat bunun istatistiksel açıdan anlamlı olmadığını belirtmişlerdir (p>0.05). İnfertil bireylerde azospermi grubu ve OAT hasta grubu sınıflandırmasında, ilginç bir şekilde, MTR 2756GG genotiplerinin azospermi grubunda fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca MTR A2756G ve A66G polimorfizmlerini araştırmışlar: 325 kişilik kontrol grubunda MTR (rs1805087) A2756G yabanıl, heterozigot ve mutant genotip oranlarını AA %78.46, AG %20.31, GG %1.23; 360 kişilik çalışma grubunda ise AA %75.00, AG %21.94, GG %3.06 olarak bulmuşlar ve gruplar arasında istatistiksel bir farklılığın olmadığını rapor etmişlerdir (p>0.05). A66G polimorfizmi için (rs1801394) ise yabanıl, heterozigot, mutant genotip oranlarını kontrol grubunda AA %22.15, AG %68.92, GG %8.92 ve çalışma grubunda AA %17.78, AG % 69.44, GG %12.78 olarak bulmuşlar ve çalışma grubunda mutant genotip oranının belirgin olarak yükselmiş olduğunu belirtmişlerdir (p<0.05). Bu sonuçlar MTHFR C677T, MTR A2756G ve MTRR G66A genotiplerinin erkek infertilitesinde önemli olduğunu vurgulamaktadır.

Bizim çalışmamızda MTR A2756G polimorfizminin AA, AG ve GG genotip sıklıkları kontrol grubunda sırasıyla %64, %34, %1 ve çalışma grubunda %54, %39, %7 olarak belirlenmiş ve MTR A2756G polimorfizmindeki G allelin artışı kontrol grubuna oranla çalışma grubunda istatistiksel olarak anlamlı

bulunmuştur ($p < 0.05$). Ayrıca MTRR A66G polimorfizminin yabancıl, heterozigot ve mutant genotip oranları kontrol grubunda sırasıyla %9, %78 ve %13 ve çalışma grubunda ise %4, %73 ve %23 olarak bulunmuştur. Bu oranlara göre MTRR A66G polimorfizminin kontrol ve çalışma grubu arasında istatistiksel olarak bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($p > 0.05$).

Bunun haricinde yapılan incelemelerle farklı etnik gruplarda A ve G allel dağılımlarının farklı sıklıklarda olduğu belirtilmektedir. Avrupa'da mutant genotip frekansının (0.276) yabancıl genotipe (0.379) yakın olduğu Asya'daki Japon popülasyonunda mutant genotip frekansının 0.140, yabancıl genotipin frekansının ise 0.535 olduğu gösterilmiştir. Çin popülasyonunda ise mutant genotipin frekansı 0.045, normal genotipin frekansı 0.545 olarak belirlenmiştir.^[17] Bu farklılıklar nedeniyle farklı toplumlardaki homojenite ve heterojeniteye bağlı olarak etnik gruplar arasında değişimlerin söz konusu olduğu ileri sürülmektedir.

Araştırmamız sonucunda erkek infertilitesinde MTR A2756G polimorfizminde G allelinin sadece hasta grubunda yüksek bulmamızın daha ileriki çalışmalara ışık tutacağını ve olgu sayısının artırılmasının sonuçlarımızı pekiştireceğini düşünmekteyiz.

Çıkar çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışmasının söz konusu olmadığını bildirmişlerdir.

Kaynaklar

- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:107.
- MTRR 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase [Homo sapiens]. Gene ID: 4552.
- Gürkan K. Smith genel üroloji. 14. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1999.
- Vaughn JD, Bailey LB, Shelnutt KP, Dunwoody KM, Maneval DR, Davis SR, et al. Methionine synthase reductase 66A->G polymorphism is associated with increased plasma homocysteine concentration when combined with the homozygous methylenetetrahydrofolate reductase 677C->T variant. *J Nutr* 2004;134:2985-90.
- Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase: cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem* 1997;272:3628-34.
- Jacques PF, Bostom AG, Selhub J, Rich S, Ellison RC, Eckfeldt JH, et al. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis* 2003;166:49-55.
- Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 1996;5:1867-74.
- Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:3786-91.
- Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JW, et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 2001;157:451-6.
- Lee HC, Jeong YM, Lee SH, Cha KY, Song SH, Kim NK, et al. Association study of four polymorphisms in three folate-related enzyme genes with non-obstructive male infertility. *Hum Reprod* 2006;21:3162-70.
- Singh K, Singh SK, Sah R, Singh I, Raman R. Mutation C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with male infertility in an Indian population. *Int J Androl* 2005;28:115-9.
- Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169-72.
- Zhang Z, Shi Q, Liu Z, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1188-93.
- Bezold G, Lange M, Peter RU. Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and male infertility. *N Engl J Med* 2001;344:1172-3.
- Eibisch IM, van Heerde WL, Thomas CM, van der Put N, Wong WY, Steegers-Theunissen RP. C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism interferes with the effects of folic acid and zinc sulfate on sperm concentration. *Fertil Steril* 2003;80:1190-4.
- Stuppia L, Gatta V, Scarcioffa O, Colosimo A, Guanciali-Franchi P, Calabrese G, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and male infertility in Italy. *J Endocrinol Invest* 2003;26:620-2.
- Single Nucleotide Polymorphism. Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1801394

Yazışma (Correspondence): Dr. Ali Şahin Küçükaslan.
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova 35100 İzmir, Türkiye.
Tel: 0232 390 22 60 e-posta: ashk1919@gmail.com
doi:10.5152/tud.2011.008