

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

46,XY DİŞİ FENOTİPLİ HASTALARDA ETİYOLOJİK
FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. FATMA NİHAL DİLEK

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. E. FERDA PERÇİN

ANKARA
NİSAN 2014

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**46,XY DİŞİ FENOTİPLİ HASTALARDA ETİYOLOJİK
FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. FATMA NİHAL DİLEK**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. E. FERDA PERÇİN**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2012-76 proje kod numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
NİSAN 2014**

KABUL VE ONAY

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Savunma Sınav Tutanağı

07/05/2014

Adı ve Soyadı	Fatma Nihal Dilek
Baba Adı	Mustafa
Doğum Yeri/Tarihi	Ankara / 13.04.1982
Diploma Tarihi/Diploma No	30.06.2006 / 131861
Mezun Olduğu Fakülte	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	Yıl: 3 Ay:10
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: "46,XY karyotipli, dişi fenotipli hastalarda etyolojik faktörlerin araştırılması"

JÜRİ KARARI: Başarılı

JÜRİ ÜYELERİ:

BAŞKAN

Prof.Dr.E.Ferda Reçen

Prof.Dr.Meral Yirmibes Karaoğuz

Prof.Dr.Mehmet Ali Ergün

Doç.Dr.Esra Tuğ

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik asistanlığım boyunca uzmanlık eğitimimin yanı sıra sosyal, etik ve ahlaki değerler bakımından değerli katkıları olan hocalarımdan başta tez danışmanım, zor günlerimde bir anne gibi yaklaşan, tez çalışmam süresince sabırla emeğini ve desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız çok değerli hocam Prof. Dr. Ferda Perçin'e çok teşekkür ederim. Her türlü sıkıntıda kapısını çalabildiğim, eğitimciliğinin yanı sıra şefkat ve ilgisini esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz'a, asistanlığım boyunca ve tez çalışmalarım süresince her türlü soruma sabırla cevap veren pratik yaklaşımlarıyla örnek aldığım sayın hocam Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün'e yardımlarından dolayı, kendisine akıl danışmaktan çekinmediğim, bir abla gibi gördüğüm sayın Doç. Dr. Esra Tuğ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Hülya Kayserili, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Endokrinoloji Anabilim dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Nurçin Saka ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim dalı Moleküler Tıp Laboratuvarı yöneticisi Prof. Dr. Afig Berdeli hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Birlikte sevgi, saygı, güven ve işbirliği içinde çalıştığım, hepsini tanımış olmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Dr. Kadri Karaer, Dr. Ayşegül Kaymak, Dr. Büşranur Çavdarlı, Dr. Guyem Özgen, Dr. Abdullatif Bakır, Dr. Gülsüm Kayhan, Dr. Bayram Taşkın, Dr. Taha Bahsi, Dr. Hanife Saat, Dr. Pelin Özyavuz Çubuk, Dr. Aysel Tekmenuray ve Dr. Serdar Mermer, ile Bio.İşıl Küçün Kiraz, Uzm.Bio. Derya Karaer, Uzm.Bio. Sezen Güntekin, Uzm.Bio. Ebru

Aytekin, Uzm. Bio. Halide Gül Akyar, Esra Küçük ve sekreterimiz Mehtap Tırpan Yılmaz’a çok teşekkür ederim.

Hayatım ve eğitimim boyunca yanımda olan, varoluş vesilem, huzur kaynağım, evlatları olmaktan sonsuz mutluluk duyduğum, varlıklarıyla bana güç veren annem ve babam ile birbirinden kıymetli, birlikte olmaktan keyif aldığım her zaman yanımda olan kardeşlerim, canlarım Bilal, Zeynep Nur ve Feyza Hilal’e çok teşekkür ederim.

CANIM ANNEME VE BABAMA

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR	vi
GENLERİN AÇIK İSİMLERİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Cinsiyet Belirlenmesi ve Gelişimi.....	3
2.2. Cinsiyet Gelişim Embriyolojisi	4
2.2.1. Gonadlar	4
2.2.2. Testis Farklılaşması.....	5
2.2.3. Over Farklılaşması	6
2.2.4. Genital Duktusların Farklılaşması.....	7
2.2.4.1. Erkeklerde Genital Kanalların Farklılaşması	7
2.2.4.2. Kadınlarda Genital Kanalların Farklılaşması.....	8
2.3. Cinsiyet gelişiminde etkisi olan genler	9
2.3.1. Sex-determining region on the chromosome Y (SRY) geni	14
2.3.2. SOX9 Geni (SRY-Box 9)	17
2.3.3. Steroidogenic factor/NR5A1; Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 geni (SF1 geni).....	18
2.3.4. Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1 (NR0B1, DAX1) geni	19
2.3.5. Wingless-type MMTV integration site family,member 4 geni (WNT4) geni	20
2.3.6. WT1 geni (Wilms Tümör 1)	21
2.3.7. ATRX geni (Alfa Talasemi Mental Retardasyon Sendromu X'e bağlı/ X'e bağlı nükleer protein geni).....	24
2.3.8. Chromobox Homolog Protein 2 (CBX2)Geni (17q25)	25

2.3.9. Cinsiyet gelişiminde etkisi olan diğer genler	27
2.4. Cinsiyet Gelişim Anomalileri.....	31
2.4.1. Şüpheli Genitalya	31
2.4.2. Seks Reversal	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. HASTA GRUBU.....	42
3.2. DNA İZOLASYONU.....	44
3.2.1. DNA Eldesi İçin Gerekli Malzemeler	44
3.2.2. DNA Eldesi Yöntemi	44
3.3. Tüm Genom Amplifikasyonu.....	45
3.4. DNA DİZİ ANALİZİ	48
3.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Eldesi	48
3.4.2. PZR Örneklerinin Agaroza Jelde Yürütülmesi	52
3.4.3. DNA dizi analizi.....	53
3.5. CYTOGENETICS WHOLE-GENOME 2.7M ARRAY ÇALIŞMASI (Affymetrix®).....	56
3.3.1. Tüm Genom Amplifikasyonu.....	56
3.3.3. Fragmentasyon- İşaretleme	60
3.3.4. Hibridizasyon	61
3.3.5. Yıkama, Boyama ve Arrayların Taranması.....	63
3.3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	65
4. BULGULAR	67
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ	98
7. KAYNAKLAR.....	100
8. ÖZET.....	110
9. SUMMARY	112
10. ÖZGEÇMİŞ	114
11. EKLER.....	116

KISALTMALAR

AD	Anabilim Dalı
A-	Array (Affymetrix® Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array)
Bç	Baz çifti
BMI/MEL18	B hücre spesifik Moloney Mürin Lösemi Virüs Entegrasyon Site 1
°C	Derece
	Karşılaştırmalı genom hibridizasyonu (Komperatif genomik hibridizasyon)
CGH	
CGB	Cinsiyet Gelişim Bozukluğu
CNV	Kopya sayısı değişikliği (Copy Number Variation)
	DatabasE of Chromosome Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources
DECIPHER	
DGV	Database of Genomic Variants
DHT	Dihidrotetosteron
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DS	Denatürasyon solüsyonu
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FISH	Florasın İn Situ Hibridizasyon/ Floresan in situ Hibridizasyon
Gr	Gram
gDNA	Genomik DNA
HGMD	The Human Gene Mutation Database
HMG-box	High Mobility Group box
<i>Hox</i>	Homeobox
K	Lizin

KAH	Konjenital Adrenal Hiperplazi
kD	Kilodalton
KD	Kamptomelik Displazi
Kb	Kilobaz
KRAB-O	Krüppel-associated box only
KTS	K (Lizin), T (Treonin), S (Serin)
Lt	Litre
µg	Mikrogram
MAF	Global Minor Allel Frequency
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
M	Molar
Mb	Megabaz
Ng	Nanogram
NLS	Nükleer Lokalizasyon Sinyalleri
NHERF2	Na/K exchanger regulatory factor 2
NS	Nötralizasyon solüsyonu
OMIM	On-Line Mendelian Inheritance in Man
PcG	Polycomb group
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PRC1	Polycomb-Repressive Complex 1
PRC2	Polycomb- Repressive Complex 2
RING	Ring Finger Protein
RNA	Ribonükleik asit
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
S	Serin

SDS	Sodyumdodesil Sülfat
SIP-1	<i>SRY</i> -interacting protein-1
SLO	Smith-Lemli-Opitz
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi (Single Nükleotit Polimorphism)
T	Treonin
TBE	Tris-borik asit-EDTA
TE	Tris-HCl EDTA
U	Ünite
U.V.	Ultraviyole
WAGR	Wilms tümör, aniridi, genitoüriner anomaliler, mental retardasyon
WGA	Tüm genom amplifikasyonu/ Whole Genome Amplification
5-AR	5 alfa redüktaz
5-ARD	5 alfa redüktaz enzim eksikliği

GENLERİN AÇIK İSİMLERİ

<i>ACTH</i>	Adrenokortikotropik Hormon
<i>AMH</i>	Antimülleryan Hormon
<i>ATRX</i>	Alfa talasemi mental retardasyon sendromu, X'e bağlı geni/ Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked/ X-linked nuclear protein gene
<i>BREA2</i>	Breast cancer estrogen-induced apoptosis 2
<i>CBX2/ M33</i>	Chromobox homolog protein 2 (Faredeki analogu, M33'tür)
<i>C2ORF80</i>	Chromosome 2 open reading frame 83
<i>CYP11B1</i>	Cytochrome p450, subfamily xib, polypeptide 1
<i>CYP11B2</i>	Cytochrome p450, subfamily xib, polypeptide 2
<i>CYP21A2/ P450c21</i>	Cytochrome p450, Family 21, Subfamily a, Polypeptide 2
<i>CYP11B1</i>	Cytochrome p450, Subfamily XIb, Polypeptide 1
<i>DAX1</i>	Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1:NR0B1
<i>DHH</i>	Desert Hedgehog gene
<i>DMRT1</i>	Doublesex and mab-3 related transcription factor 1
<i>EMX2</i>	Empty spiracles, drosophila homolog 2
<i>FAM83H</i>	Family with sequence similarity, member H
<i>FAM189A2</i>	Family with sequence similarity 189, member A2
<i>FGFR2</i>	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü/Fibroblast growth factor receptor 2
<i>FGF9</i>	Fibroblast growth factor 9/Fibroblast büyüme faktörü 9
<i>FOXL2</i>	Forkhead box L2
<i>FSH</i>	Foliküler stimüle edici hormon
<i>GLI4</i>	Gli-Kruppel family member 4
<i>HSD17B3</i>	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase

<i>JRK</i>	Jerky Mouse homolog
<i>MAP3K1</i>	Mitogen activated kinase kinase kinase 1
<i>MIF</i>	Mülleryan İnhibisyon Faktör
<i>PIP5K1B</i>	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta
<i>PLEC1</i>	Plectin 1
<i>PRKACG</i>	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, gamma
<i>PUF60</i>	Poly-U binding splicing factor 60KDa
<i>PYCRL</i>	Pyrroline-5-carboxylate reductase-like
<i>RECQL4</i>	RECQ protein-like 4/ATP-Dependent DNA Helicase Q4
<i>RHPN1</i>	Rhopilin, Rho GTPase Binding Protein 1
<i>SRY</i>	(Y kromozomu üzerinde cinsiyet belirleyen bölge/ Sex-determining region on Y
<i>SF1</i>	Steroidogenik faktör1
<i>SLC39A4</i>	Solute carrier family 39 member 4
<i>SLURP1</i>	Secreted ly6/plaur domain-containing protein 1
<i>SNF2</i>	Sucrose nonfermenting 2
<i>SOX9</i>	SRY related HMG box 9
<i>SRD5A2</i>	Steroid 5-alpha-reductase-2 gene
<i>SUPT3H</i>	Suppressor of Ty 3 homolog (S. cerevisiae)
<i>TIGD5</i>	Tigger transposable element derived 5
<i>TSTA3</i>	Tissue specific transplantation antigen P35B
<i>TOP1MT</i>	Topoisomerase 1 mitochondrial
<i>WNT4</i>	Wingless-type MMTV integration site family, member 4
<i>WT1</i>	Wilms tümör1
<i>ZC3HC</i>	Zinc Finger, C3HC-Type Containing 1
<i>ZFP41</i>	Zinc Finger Protein 41
<i>17β-HSD</i>	17β hidroksisteroid dehidrojenaz

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	Isı döngüleyicide uygulanan amplifikasyon programı	47
Tablo 3.2.	Isı döngüleyicide uygulanan amplifikasyon programı	48
Tablo 3.3.	Isı döngüleyicide uygulanan amplifikasyon programı	51
Tablo 3.4.	Isı döngüleyicide uygulanan amplifikasyon programı	54
Tablo 3.5.	Isı döngüleyicide uygulanan amplifikasyon programı	55
Tablo 3. 6.	Isı döngüleyicide uygulanan amplifikasyon programı	59
Tablo 3.7.	Isı döngüleyicide uygulanan fragmentasyon ve işaretleme programı.....	61
Tablo 3.8.	Isı döngüleyicide uygulanan denatürasyon programı	62
Tablo 3.9.	Yıkama ve Holding Bufferların Tüplere Bölünmesi	64
Tablo 4.1.	Olguların <i>WT1</i> geni dizi analizi sonuçları, bulunan SNP'ler ve rs numaraları	69
Tablo 4.2.	<i>WT1</i> geni analiz sonuçları ve SNP allel frekansları	70
Tablo 4.3.	Olgu 1'e ait array analizi sonuçları.....	72
Tablo 4.4.	Olgu 2'ye ait array analizi sonuçları.....	72
Tablo 4.5.	Olgu 3'e ait array analizi sonuçları.....	72
Tablo 4.6.	Olgu 4'e ait array analizi sonuçları.....	73
Tablo 4.7.	Olgu 5'e ait array analizi sonuçları.....	73
Tablo 4.8.	Olgu 6'ya ait array analiz sonuçları.....	74
Tablo 4.9.	Olgu 7'ye ait array analizi sonuçları.....	74
Tablo 4.10.	Olgu 8'e ait array analizi sonuçları.....	74
Tablo 4.11.	Olgu 9'a ait array analizi sonuçları.....	74
Tablo 4.12.	Olgu 10'a ait analiz sonuçları.....	74
Tablo 5.1.	Literatürde bildirilen gonadal disgenezili olgulara yapılan array analizi sonucunda belirlenen aday kromozom bölgeleri ve	

	bizim çalışmamızdaki olguların array analizi sonucunda görülen değişiklikler	87
Tablo 5.2.	Olgu 1, Olgu 4 ve Ledig ve ark.'nın çalışmasındaki Olgu 20'ye ait 8. kromozomun q24.3 bölgesinde array analizi sonucunda bulunan duplikasyonların başlangıç-bitiş bölgeleri ve belirlenen aday genler	90
Tablo 5.3.	Norling ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada ve bizim çalışmamızda <i>CBX2</i> geninin dizi analizinde bulunan SNP'ler	97

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	46,XY ve 46,XX karyotip yapılarının cinsiyet gelişimi üzerine etkileri.....	4
Şekil 2.2.	Cinsiyet gelişiminde etkisi olan genler ve yapılan hayvan deneyleriyle belirlenen aday genler, <i>ATRX</i> (Alfa Talasemi Mental Retardasyon sendromu, X'e bağlı geni/Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked/ X-linked nuclear protein gene), <i>CBX2</i> (Chromobox homolog protein 2), <i>DAX1</i> (Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1:NR0B1), <i>DHH</i> (Desert Hedgehog gene) <i>FGF9</i> (Fibroblast growth factor 9), <i>FOXL2</i> (Forkhead box L2), <i>MAP3K1</i> (Mitogen activated kinase kinase kinase 1), <i>SF1</i> (Steroidogenik faktör1), <i>SOX9</i> (SRY box 9), <i>SRY</i> (Sex determinig region on Y), <i>WNT4</i> (Wingless-type MMTV integration site family, member 4), <i>WT1</i> (Wilms tümör1)	12
Şekil 2.3.	<i>SRY</i> geninin yapısı.....	15
Şekil 2.4.	<i>SRY</i> geninin HMG domain fonksiyonu	15
Şekil 2.5.	<i>WT1</i> geninin yapısı.....	22
Şekil 2.6.	<i>WT1</i> geninin izoformları	22
Şekil 2.7.	Dax1 geni TATA-box bölgesinin 5' ucunda yer alan yer alan G-C zengin Wt1 bağlanma bölgeleri.....	23
Şekil 2.8.	<i>CBX2</i> geninin yapısı ve izoformları	27
Şekil 2.9.	XY feminize hastada etyolojik nedenler	40
Şekil 2.10.	XX maskulinize hastada etyolojik nedenler.....	41
Şekil 3.1.	Array 2.7 çalışmasının basamakları	57
Şekil 4.1.	Olgu 1'e ait <i>SRY</i> geni dizi analizi örneği	67
Şekil 4.2.	Olgu 2'ye ait <i>SRY</i> geni dizi analizi örneği	68
Şekil 4.3.	Olgu 2'ye ait <i>CBX2</i> geninin (5. ekzon) dizi analizi örneği	75
Şekil 4.4.	Olgu 4'e ait <i>CBX2</i> geninin dizi analizi ve tek nükleotid değişikliği	76

Şekil 4.5. Olgu 5'e ait CBX2 geninin dizi analizi ve tek nükleotid değişikliği.....	76
Şekil 5. 1. Yatsenko ve ark. tarafından bildirilen 10q terminal delesyonlu 5 olgu ile literatürde daha önce bildirilmiş olan 10q terminal delesyonlu olguların delesyon bölgeleri ve belirlenen kritik bölgeler.....	85

1. GİRİŞ

Cinsiyet gelişimi, birçok faktörün etkisinde ortaya çıkan oldukça karmaşık bir süreçtir. Cinsiyet, fertilizasyonda belirlenmekte ve 46,XX karyotipli fetusta dişi yönünde, 46,XY karyotipli fetusta erkek yönünde gelişmektedir. Cinsiyet belirlenmesi ve farklılaşması birçok genin etkisiyle olmaktadır. Bu genler, cinsiyet kromozomlarının yanısıra otozomal kromozomlar üzerinde de bulunmakta ve bu genlerde oluşan mutasyonlar Cinsiyet Gelişim Bozuklukları'na (CGB) neden olabilmektedir. CGB, şüpheli genitalyadan komplet seks reversala kadar değişebilen klinik özelliklerle ortaya çıkabilmektedir. Y kromozomu üzerinde yer alan *SRY* (Y kromozomu üzerinde cinsiyet belirleyen bölge/ Sex-determining region on Y) geni, cinsiyetin belirlenmesi ve farklılaşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bunun yanında *SOX9*, *SF1*, *WT1*, *DAX1*, *WNT4*, *DMRT1*, *DHH*, *FGF9*, *MAP3K1*, *FOXL2*, *ATRX* ve *CBX2* genlerinin de cinsiyet gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir. Literatürde 9. kromozomun kısa kolu ve 10. kromozomun uzun kolunun delesyonları ile X kromozomunun p21-p22 bölgesinin duplikasyonunun da seks reversala neden olduğu bildirilmektedir.

Bu çalışmanın dahil olma kriterleri; 46,XY karyotipine sahip olma, dişi yönünde fenotip, *SRY* geni varlığı, FSH-LH seviyesinin yüksek olması, testosteron seviyesinin kadın cinsiyete göre normal olması ve uterus varlığı olarak belirlenmiş, bu özellikleri taşımayan, steroidogeneizde görevli enzim eksikliği ve sendromik özelliklere sahip olan olgular çalışmaya dahil edilmemiştir. Dahil olma ve dışlama kriterleri esas alınarak çalışma kapsamına alınan, 46,XY seks reversallı 10 olguda, etiyolojik nedeni ortaya çıkarmak amacıyla, *SRY*, *WT1* ve

CBX2 genlerine dizi analizi ve Array (Affymetrix® Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array) çalışması yapılmıştır. Seks reversal ile birliktelik gösteren sendromlara yol açan genler çalışmaya dahil edilmemiştir.

Seks reversallı hastaların %15'inde *SRY* geninde mutasyon tespit edilebilmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada ilk aşama olarak 46,XY seks reversallı hastalarda *SRY* geninin varlığının araştırılması ve bu genin dizi analizinin yapılmasının yararlı olacağı düşünülmüştür. Daha sonra seks reversala neden olduğu bilinen *WT1* genine dizi analizi yapılmış ve patojenik mutasyon saptanmamıştır. Tüm olgulara daha önce bildirilen delesyon/duplikasyonları ekarte etmek amacıyla da Array (2.7M) çalışması yapılmış, bilinen delesyon ve duplikasyonlar tespit edilmemiştir. Ancak Array analizi sonucunda, gonadlarda eksprese olduğu bilinen, spermatogenez ve hücre farklılaşmasında rol alan *ZFP41* geni başta olmak üzere, *GLI4*, *TOP1MT*, *RHPN1*, *ZC3HC*, *TIGD5*, *PYCRL*, *TSTA3*, *BREA2*, *PUF60* genlerinin seks reversal için aday genler olabileceği düşünülmüştür

Literatürde 46,XY seks reversallı bir olguda, bileşik (compound) heterozigot mutasyonu bildirilmiş olan *CBX2* geni, farelerde yapılan çalışmalarda CGB'ye neden olduğu bilinen bir gendir. Bu nedenle çalışmamızda *SRY*, *WT1* genleri dizi analizlerinde ve Array analizinde önceden bildirilmiş herhangi bir patolojik değişiklik bulunamayan olgulara *CBX2* geninin dizi analizi yapılmış ve olguların hiçbirinde mutasyon saptanmamıştır.

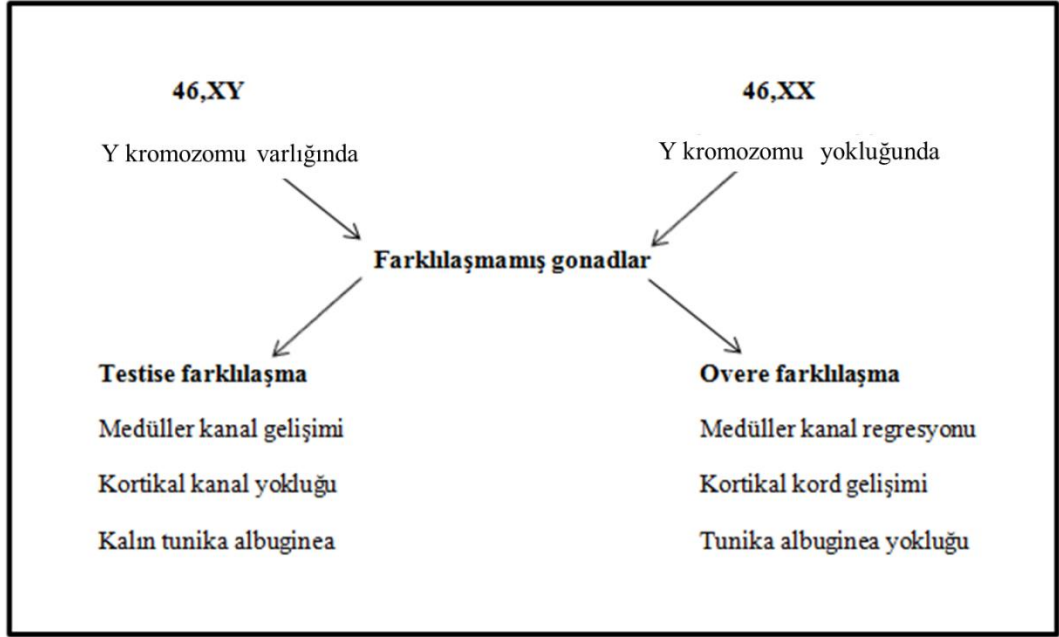
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Cinsiyet Belirlenmesi ve Gelişimi

Cinsiyet belirlenmesi ve gelişimi, genetik, hormonal ve psikososyal etkenlerin rol aldığı bir süreçtir. Yaşamın ilk haftasında bir fetusun ne anatomik ne de hormonal cinsiyeti vardır, yalnızca karyotipi kadın ya da erkek olduğunu gösterir (1).

Cinsiyet farklılaşması; genetik cinsiyetin belirlenmesi, gonadların farklılaşması, iç ve dış genital yapıların farklılaşması ve beyin- hipotalamus aksının farklılaşmasını içeren 4 basamakta incelenebilmektedir (2).

Cinsiyet gelişimi, cinsiyet kromozomlarının varlığı ile başlar ve embriyo, konsepsiyon sonrası 6. haftaya kadar bipotansiyel gonad yapısına sahiptir. Cinsiyetin belirlenmesi, fertilizasyonda kromozomların dağılımı ile gerçekleşmektedir. İnsanlarda ikisi cinsiyet kromozomları olmak üzere 46 adet kromozom bulunmaktadır. Cinsiyet gelişimi; iki X kromozomu olan bireyde dişi yönünde olurken, bir X bir Y kromozomu olan bireyde erkek yönünde olmaktadır (Şekil.2.1). Daha sonra, cinsiyet kromozomları dışında bazı otozomal genlerin de etkisiyle cinsiyet gelişimi tamamlanmaktadır (3).



Şekil 2.1. 46,XY ve 46,XX karyotip yapılarının cinsiyet gelişimi üzerine etkileri

2.2. Cinsiyet Gelişim Embriyolojisi

2.2.1. Gonadlar

Bir embriyonun cinsiyeti kromozomal olarak fertilizasyonda belirlenirken, gonadlar fetal hayatın 7. haftasından sonra erkek ya da dişi yönde gelişmektedir. Gonadlar “genital ridge”(genital kabarıklık) ya da “gonadal ridge” (gonadal kabarıklık) denilen bir çift çizgisel yapı olarak ortaya çıkmakta ve mezenkimal ve epitelyal dokunun proliferasyonu ile şekillenmektedir. Germ hücreleri ise, gelişimin 6. haftasına kadar izlenmemektedir (2).

Primordial germ hücreleri, allantois kesesine yakın yolk kesesi duvarında bulunan endoderm hücrelerinden köken almakta ve fetal hayatın 3. haftasında gonadal kabarıklığa doğru göç etmeye başlamaktadır. 4 hafta süren bu göç hindgutun dorsal mezenterisi boyunca ameboid hareketlerle gerçekleşmekte ve

primordial germ hücreleri 5. haftada primitif gonadlara ulaşmaktadır. Genital kabarıklığa ulaşmalarında hata olduğunda ise gonadlar gelişmemektedir. Primordial germ hücreleri, gonadların over ya da testis yönünde gelişmesinde indükleyici bir etki göstermektedir (2).

Kısacası, primordial germ hücrelerinin hareketi öncesi ve hareketleri boyunca; genital kabarıklığındaki epitelyal hücreler, mezenkim doku içerisine penetre olurlar. Burada primitif seks kordlarını oluştururlar. Hem erkek hem dişi embriyolarda, bu doku yüzey epiteli ile ilişkilidir ve gonadın dişi ya da erkeğe ait olduğu ayırımının mümkün olmadığı bu evrede söz konusu yapı farklılaşmamış gonad olarak isimlendirilmektedir (2).

2.2.2. Testis Farklılaşması

Genetik olarak erkek olan embriyonun primordial germ hücreleri, X ve Y kromozomlarını taşımaktadır. Y kromozomunda bulunan *SRY* geni etkisinde; proliferen olan primitif seks kordları, medullaya penetre olarak testis ve medüller kordları oluşturmaktadır. Glandın hilumunda, daha sonra “rete testis” olarak isimlendirilecek olan hücrelerin dizilimi gerçekleşmektedir. Gelişim sürecinde fibröz konnektif doku, testis kordlarını yüzey epitelden ayıran tunika albugineayı oluşturmaktadır (2).

Primitif germ hücreleri ve yüzey epitelden köken alan sustentaküler sertoli hücrelerinden oluşan testis kordları, 4. ayda at nalı şeklini almakta ve rete testis olarak devam etmektedir. Leydig hücreleri, gonadal kabarıklığındaki mezenkimden köken almakta ve testis kordlarının arasında bulunmaktadır. Leydig

hücreleri kordların farklılaşmasından kısa bir süre sonra gelişmektedir. Leydig hücreleri gestasyonun 8. haftasında, testosteron üretimine başlamakta ve böylece testis, hem seksüel farklılaşma hem de iç ve dış genital yapı üzerinde etkisini göstermektedir (2).

Testis kordları, pubertal döneme kadar solid olarak izlenmekte ve lümen oluştuğunda seminifer tübül olarak isimlendirilmektedir. Seminifer tübüller kanalize olduklarında rete testis tübüleriyle ilişki kurmakta ve duktuli efferentlere açılmaktadır. Duktuli efferentler mezonefrik sistemin boşaltıcı tübülleridir. Rete testis ve mezonefrik (wolfian) kanallar duktus deferensi oluşturmaktadır (2).

2.2.3. Over Farklılaşması

Dişi embriyoda XX cinsiyet kromozom yapısı bulunmaktadır. Primitif germ hücrelerini içermekte olan primitif seks kordları overlerin medüller kısmını kaplamaktadır. Daha sonra primitif germ hücreleri vasküler stromaya yer değiştirerek overyan medullayı oluşturmaktadır (2).

Dişi gonadın yüzey epiteli, erkek gonad yapısından farklı olarak, prolifer olmaya devam etmektedir. 7. haftada korteks, mezenşim doku içine doğru uzanarak ikincil cinsiyet kordlarını oluşturmaktadır. 3. ayda bu kordlar izole hücre kümelerini oluşturmaktadır. Primordiyal hücreler bu kümelerin içine yerleşerek prolifer olmaya devam etmekte ve oogonium oluşmaktadır. Oogoniumun etrafı, folliküler hücreler adı verilen epitelyal hücreler tarafından sarılmaktadır. Oogonia ve folliküler hücreler primer follikülü oluşturmaktadır (2).

XX cinsiyet kromozomu yapısına sahip embriyoda, XY cinsiyet kromozom yapısını taşıyan embriyonun medüller hücre kordları gerilemekte, sekonder kortikal kordlar gelişmektedir (2).

2.2.4. Genital Duktusların Farklılaşması

Hem erkek hem dişi embriyo, mezonefrik (wolfian) ve paramezonefrik (müllerian) olmak üzere bir çift genital duktus yapısına sahiptir. Paramezonefrik kanal, “ürogenital ridge”in (ürogenital kabarıklık) ön yüzünde longitudinal bir yerleşim göstermektedir. Paramezonefrik kanalın baş tarafı abdominal boşluğa baca şeklinde açılmakta, kuyruk tarafı ise, kaudomedial olarak yerleşmek üzere önce mezonefrik duktusu çaprazlayarak yer değiştirmektedir. Karşı taraftaki paramezonefrik kanal ile, aralarında bir septumun varlığında orta hatta birleşmekte ve daha sonra bu septum ortadan kalkarak uterin kanal oluşmaktadır. Bu birleşik yapının kaudal ucu, ürogenital sinüsün arka duvarında paramezonefrik ya da müllerian tüberkül adı verilen bir çıkıntı oluşturmaktadır. Mezonefrik kanallar müllerian tüberkülün her iki yanından ürogenital sinüse açılmaktadır (2).

2.2.4.1. Erkekte genital kanalların farklılaşması

Mezonefroz gerilerken, epigenital tübüller gibi birkaç ekskretör tübül, rete testis kanallarıyla ilişki kurarak sonunda efferent duktusları oluşturmaktadır. Ekskretör tübüller, testisin kaudal bölgesine aittir. Paragenital tübüller rete testis kordlarıyla ilişkili değildirler ve kalıntıları paradidim olarak bilinmektedir (2).

Apendiks epididim, mezonefrik duktusun persiste olmasıyla oluşmakta ve ana genital kanal yapısını meydana getirmektedir. Efferent duktus giriş kısmının hemen altında mezonefrik kanal uzanmakta ve epididimi kıvrıntılı ve sarmaşık bir forma dönüştürmektedir. Epididimin kuyruğundan seminal veziküllere kadar, mezonefrik kanallar kalın muskuler bir örtü ile kaplıdır ve duktus deferens adını alır. Seminal veziküllerin yanındaki bölgede ejakülator kanal bulunmaktadır. Erkeklerde testis apendiksinde çok küçük bir bölge dışında, paramezonefrik kanallar regrese olmaktadır (2).

2.2.4.2. Kadınlarda Genital Kanalların Farklılaşması

Paramezonefrik kanallar, dişide ana genital kanal yapısını oluşturmaktadır. Her kanal için 3 bölümden bahsedilebilir;

1. Abdominal boşluğa açılan *vertikal baş kısmı*
2. Mezonefrik kanalı çaprazlayan *horizontal parça*
3. Karşı paramezonefrik kanal yapısıyla birleşen *kuyruk kısmı*

Overin alt kısmı ile ilk 2 parça tuba uterina olarak isimlendirilmektedir, kuyruk kısmı ise uterin kanalı oluşturmaktadır. Paramezonefrik kanalın 2. parçası mediokaudal olarak yer değiştirdiğinde, ürogenital çıkıntı yavaş yavaş yatay pozisyon almaktadır (2).

2.3. Cinsiyet Gelişiminde Etkisi Olan Genler

Cinsiyet gelişimi, cinsiyet ve otozomal kromozomların üzerinde bulunan birçok gen tarafından düzenlenmektedir. Bu genler, geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar ve hayvan deneyleri ile tespit edilmiştir. Bilinen genlerin dışında cinsiyet gelişiminde etkisi olduğu düşünülen birçok genin var olduğu da tahmin edilmektedir (4).

Cinsiyet farklılaşmasında Y kromozomunun önemi, çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. İlk defa 1959 yılında, Ford ve ark. tarafından 45,X farelerin dişi fenotipe sahip olduğu gösterilmiş ve Turner Sendromlu bir olgunun 45,X karyotipine sahip olduğu bildirilmiştir. Jacobs ve Strong, 47,XXY karyotipinin Klinefelter Sendromuna neden olduğunu göstermiştir. Daha sonra Jacobs ve ark. tarafından 48,XXY,+21 karyotipli Klinefelter ve Down Sendromu olan (double anöplodili) bir olgu tanımlanmıştır (5-7). Bu çalışmalar memeli embriyosunda; X kromozomu sayısından bağımsız olarak, Y kromozomunun varlığında, embriyonun cinsiyetinin erkek, Y kromozomu yokluğunda ise dişi yönde geliştiğini göstermektedir. Bu sonuç, ayrıca Y kromozomunun üzerinde bipotansiyel gonadların testis ya da overe farklılaşmasını sağlayan gen ya da genler olduğunun bir göstergesi olmuştur. Cinsiyet belirlendikten sonra, cinsiyet hormonları sekonder seks karakterlerinin gelişimini kontrol etmektedir (8). Bu hipoteze göre Y kromozomu üzerindeki genler insanlarda ‘TDF (Testis Determining Factor)’ ve farelerde ‘tdy’(Testis Determining Factor on the Y) olarak isimlendirilmiştir. 46,XX erkek fenotipe sahip bireylerde, Yp ve Xp

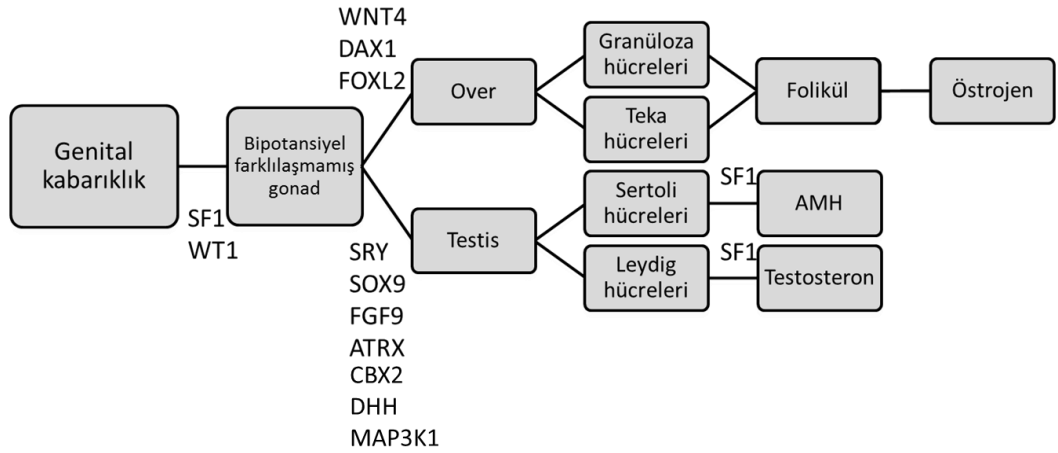
arasında translokasyonların gösterilmesi TDF'nin Y kromozomu üzerindeki lokalizasyonu hakkında fikir verici olmuştur (8).

TDF, Y kromozomu üzerinde psödootozomal bölgenin proksimalinde yer almakta ve 35 Kb'lik DNA içermektedir. Bazen mayoz bölünme sırasında X ve Y kromozomları arasında 'psödootozomal bölge'nin krossing-over'ları, TDF bölgesinin de X kromozomuna transferine neden olabilmektedir ve bu durumda 46,XX erkek fenotipi izlenmektedir. Y kromozomu delesyonları 1984 yılında, ilk kez farelerde, 1987 yılında ise insanda gösterilmiştir. Bu olgularda, daha önce tanımlanmış olan H-Y transplantasyon antijeninin ve erkek gelişiminin olmadığı tespit edilmiş, ve bu durum Y kromozomu üzerinde fazla gen bulunmadığı için H-Y antijeninin TDF/Tdy olduğunu düşündürmüştür (8).

Kromozom yapısı 46,XY olan bir embriyoda, Y kromozomunun p kolu (Yp11.3) üzerinde bulunan *Sex-determining region on the chromosome Y (SRY)* geni, *Testis Determining Factor 10 (TDF)* üreterek gonadların testise farklılaşmasına neden olmaktadır. İlk defa SRY geninin tanımlanması, 1990 yılında erkek cinsiyet gelişimi bulunan 46,XX karyotipli 4 hastanın, Y kromozomuna ait 35 Kb'lik bir bölge taşıdıklarının tespit edilmesi ile olmuştur. XY karyotipli dişilerde görülen, SRY geni nokta mutasyonları, SRY'nin erkek cinsiyet gelişimi için gerekliliğini göstermiştir (8). Daha sonra (1991) yapılan bir deney ile; 14 Kb'lik SRY geninin bulunduğu genomik parçayı taşıyan XX karyotipli farede, erkek cinsiyet gelişiminin görülmesi; SRY geninin testis gelişimi ve bunu takip eden erkek cinsiyet gelişimi için gerekli olduğunu desteklemiştir. Ayrıca bu çalışmada, XX karyotipli erkek farenin, iki X kromozomu taşıdığı ve Y

kromozomundaki spermatogenezde etkili olan genler bulunmadığı için steril olduğu bildirilmiştir (8). Daha sonra yapılan birçok çalışma ile *SRY* geni varlığının erkek cinsiyet gelişimi için gerekli ancak tek başına yeterli olmadığı gösterilmiştir (9).

McElreavey ve ark. yaptıkları bir çalışmada; *SRY* geni bulunan XY karyotipli dişi hastaların pedigrî analizleri ile; bu durumun otozomal geçişli bir mutasyon nedeniyle ortaya çıktığını ve bu durumdan sorumlu otozomal bir Z lokusu olduğunu öne sürmüşlerdir. Buna göre; Z lokusunun, erkek cinsiyet gelişiminde negatif bir etkiye sahip olduğu ve normal bir *SRY* geni varlığında, Z lokusunun baskılanarak erkek yönde gelişimin başlatılabileceği şeklinde yorumlanmıştır (9). McElreavey ve ark.'nın yapmış olduğu bu çalışmada; *SRY* geninin varlığı sadece konvansiyonel PZR yöntemi ile tespit edilmiş ancak *SRY* genine dizi analizi yapılamamıştır. Bu çalışmada *SRY* geni mutasyonları dışlanmadan, *SRY* geni intakt kabul edilmiş ve *SRY* genini düzenleyen otozomal genlerin olabileceği öne sürülmüştür. Cinsiyet gelişiminde etkili olan pek çok gen olmakla beraber, tüm 46,XY komplet gonadal disgenezili hastaların, %15'inde *SRY* genindeki mutasyonların etyolojiden sorumlu olduğu bildirilmiştir (10). Daha sonra yapılan çalışmalar ile *SRY* geni dışında cinsiyet gelişiminde etkisi olan diğer genler tespit edilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Cinsiyet gelişiminde etkisi olan genler ve yapılan hayvan deneyleriyle belirlenen aday genler, *ATRX* (Alfa Talasemi Mental Retardasyon sendromu, X'e bağlı geni/Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked/ X-linked nuclear protein gene), *CBX2* (Chromobox homolog protein 2), *DAX1* (Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1:NR0B1), *DHH* (Desert Hedgehog gene) *FGF9* (Fibroblast growth factor 9), *FOXL2* (Forkhead box L2), *MAP3K1* (Mitogen activated kinase kinase kinase 1), *SF1* (Steroidogenik faktör1), *SOX9* (*SRY* box 9), *SRY* (Sex determinig region on Y), *WNT4* (Wingless-type MMTV integration site family, member 4), *WT1* (Wilms tümör1)

Cinsiyet gelişiminde etkili olan genler ve fonksiyonlarının artması ve azalması durumunda ortaya çıkan klinik özellikler Tablo 1'de özetlenmiştir. Hayvan deneylerinde, *Fgf9* (Fibroblast büyüme faktörü/Fibroblast Growth Factor)ve *Dmrt1*(Doublesex and mab-3 related transcription factor 1) genlerinin mutasyonunun, seks reversala neden olduğu gösterilmiş fakat insanda seks reversallı olgularda bu genlerin mutasyonu tespit edilmemiştir (68). Benzer bir şekilde fare deneylerinde *M33* geninin seks reversala neden olduğu gösterilmiş ve

literatürde tek bir olguda bu genin insandaki analogu olan *CBX2* geninde bileşik heterozigot mutasyon bildirilmiştir (31).

Tablo 2.1. Cinsiyet gelişiminde etkili genler, lokusu ve fonksiyon değişikliklerinde ortaya çıkan klinik özellikler¹

Gen	Lokus	Fonksiyon azalmasında fenotip	Fonksiyon artışında fenotip
<i>SRY</i>	Yp11.3	XY kadın	XX erkek
<i>SF1</i>	9q33	XY kadın, adrenal yetmezlik	XX erkek
<i>SOX9</i>	17q24	Şüpheli genitalya / XY kadın +Kamptomelik displazi	XX erkek
<i>WT1</i>	11p13	XY kadın, böbrek defektleri, Wilm's tümörü	
<i>DAX1</i>	Xp21.3	Konjenital adrenal hipoplazi, hipogonadotropik hipogonadizm	İzole gonadal disgenezi, mental retardasyon, dismorfik görünüm, farede XY kadın
<i>CBX2</i>²	17q25	XY kadın	
<i>FGF9</i>³	13q11-13	XY kadın (hayvan modellerinde)	
<i>WNT4</i>	1p35	XX testosteron sentezi+Müllerian kanal dejenerasyonu	XY kadın, gonadal disgenezi
<i>FOXL2</i>	3q23	Prematür over yetmezliği/ Blefarofimozis ptozis epikantus inversus sendromu (insanda), XX erkek (keçide)	
<i>ATRX</i>	Xq13.3	XY kadın + Mental retardasyon, alfa talasemi	
<i>DMRT1</i>³	9p24.3	XY kadın (hayvan modellerinde)	XX,erkek (hayvan modellerinde)
<i>DHH</i>	12q13.12	XY kadın	
<i>MAP3K1</i>	5q11.2	XY kadın	

¹-Fleming A.,Vilain E.,The endless quest for sex determination genes, Clinical Genetics,67:15 25,2004. yayını esas alınarak yeniden düzenlenmiştir (11).

²-Faredeki analogu; M33

³-Hayvan deneylerinde CGB'ye neden olduğu gösterilmiş genler

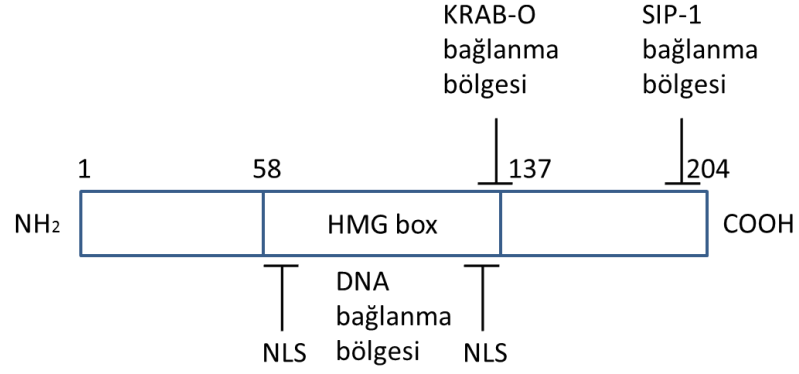
2.3.1. Sex-determining region on the chromosome Y (*SRY*) geni

SRY geni, Y kromozomu üzerinde p11.3 lokusunda yer alan tek ekzonlu bir gendir. Bu gen, 204 aminoasitlik Testis Determining Faktör (TDF) ismi verilen bir transkripti kodlar. Bu transkriptin orta 1/3'lük bölümünde 79 aminoasitlik bir DNA bağlayıcı domain olan "High Mobility Group (HMG-box)" bulunmaktadır (Şekil 2.3). HMG bölgesi evrimde türler arasında en iyi korunmuş olan bölgedir. *SRY*'nin DNA bağlayıcı domaini, DNA'nın minör oluğundaki (A/T)ACAA(T/A) dizisine bağlanmakta ve DNA'nın 60-85° bükülmesini sağlamaktadır (Şekil 2.4). *SRY* geni erkek cinsiyet gelişiminde çok önemli bir gendir. Çoğu XY karyotipli dişide, HMG-box bölgesinde mutasyon tespit edilmektedir, fakat yapılan in vitro çalışmalarda, *SRY* proteinin DNA bağlayıcı fonksiyonunu gösterebilmesi için *SRY* proteininin tam uzunluğuna sahip olması gerektiği gösterilmiştir (12).

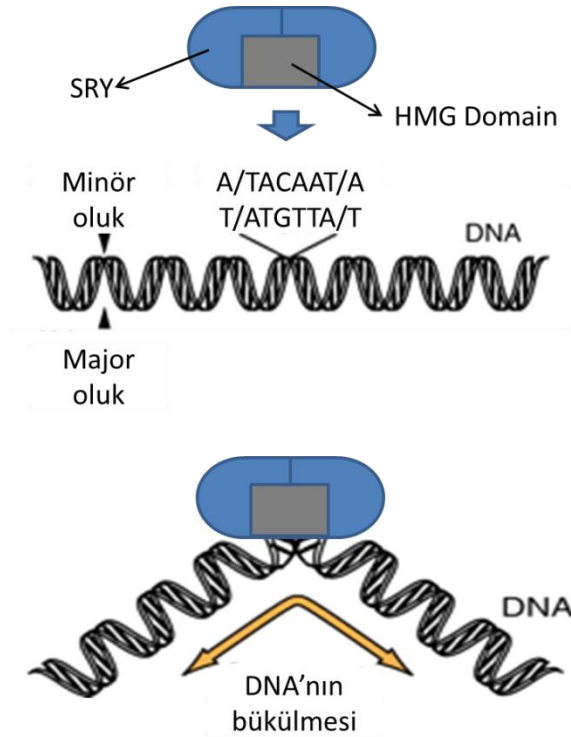
Cinsiyet gelişimini düzenleyen birçok yolak aydınlatılmış olmakla birlikte, *SRY* geninin bu yolaktaki etkisi hala tam olarak açık değildir (8). Fare deneylerinde; *Sry* transkriptlerinin, testis farklılaşmasının başladığı, erken gonad gelişimi süresince eksprese oldukları görülmektedir (8). Testis gelişiminde gerekli olan Sertoli hücrelerinin farklılaşmasında, *Sry* ekspresyonunun eşik değeri aşması gerekmektedir. XX ve XY kimerik fare embriyolarında, XY içeren somatik hücre oranı %35-40 olduğunda testis gelişirken, bu oran %10'un altına düştüğünde over gelişimi izlenmiştir (12).

HMG-box bölgesi dışındaki *SRY* bölgeleri türler arasında farklılık göstermektedir. HMG-box, DNA'ya bağlanma ve DNA'yı katlama özelliğine

sahip olmakla birlikte “n k ler lokalizasyon sinyalleri”ni (NLS) de içermektedir ( ekil. 2.3).



Şekil 2.3. SRY geninin yapısı



Şekil 2.4. SRY geninin HMG domain fonksiyonu

Seks reversal hastalarda yapılan çalışmalarda, *SRY* geninde aminoasitlerin değişmesine neden olan 72 nokta mutasyonu tanımlanmıştır (13). Bu mutasyonların çoğu HMG-box'da olmakla birlikte, bir kısmı N- (NH₂) ve C- (COOH) terminal domainlerini etkilemektedir. Hem fare hem de insanda *Sry*/*SRY* proteini '*SRY*-interacting protein-1'(SIP-1); *Na/K exchanger regulatory factor 2* (NHERF2) ve *Krüppel-associated box only* (KRAB-O) ile etkileşmekte, fakat bunların cinsiyet belirlenmesindeki rolleri bilinmemektedir. SIP-1, C- terminalde bulunan tirozin-lizin-lösin aminoasitlerini içeren motif ile KRAB-O ise HMG-box'ın C terminal bölgesine komşu olan bir domain ile etkileşmektedir.

SRY ekspresyonunun düzenlenmesinde etkisi olan birçok faktör olduğu düşünülmektedir. Farelerde *Sf1* pozitif çölemik epitelde *Sry* pozitif sertoli hücre öncüllerinin bulunması ve insanda *SF1* heterozigot mutasyonlarında XY seks reversal görülmesi, *SF1*'in erkek cinsiyet gelişim yolağındaki genlerin düzenlenmesindeki önemini göstermektedir. *WT1* geni de benzer şekilde, *SRY* geninin promotor bölgesini aktive etmekte, fakat bu etkiyi sadece “-KTS splice varyantı” ile göstermektedir. İn vitro çalışmalar, *SF/Sf11* ve *WT1/Wt1*'in insan ve domuz *SRY/Sry* promotor bölgesine bağlandıklarını ve aktive ettiklerini göstermiştir (8).

Birçok çalışma ile *SOX9*'un (*SRY*-related HMG box), *SRY*'nin hedef geni olduğu gösterilmiştir. Hayvan modellerinde, *Sox9* ekspresyonunun, *Sry* ekspresyonunun başlamasıyla testiste güçlü bir şekilde arttığı, overlerde ise azaldığı görülmüştür. 'Cell-fate mapping' fare deneyleri; *Sry*-pozitif hücrelerin, *Sox9* pozitif sertoli hücrelerine dönüştüğünü göstermiştir (8).

SOX9 geninin heterozigot mutasyonları, insanda iskelet malformasyon sendromlarından biri olan, XY seks reversal ile birliktelik gösteren kamptomelik displaziye neden olmaktadır. Tüm bunlar, insanda *SRY* geninin *SOX9* genini aktive ederek etki gösterdiğini desteklemektedir. İnsanda *SRY* geninin erkek cinsiyet gelişim yolağını aktive edebilmesi için, *SOX9* geninin gerekli olduğu yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir (8).

2.3.2. *SOX9* Geni (*SRY*-Box 9)

SOX9 geni, 17. kromozomunun q24 lokusunda bulunmakta ve *SRY* geninin de etkisiyle erkek cinsiyet gelişiminde rol oynamaktadır. *SOX9* geni 3 ekzonlu ve 509 aminoasitten oluşan bir protein sentezlemektedir. *SOX9* genindeki mutasyonlar Kamptomelik Displazi (KD), şüpheli genitalya ve XY seks reversala neden olabilmektedir. Karyotip yapısı 46,XX KD'li hastalarda normal ovaryum görülürken, 46,XY karyotipli KD'li hastaların %75'inde seks reversal dişi fenotip görülmektedir.

SRY geninin *SOX9* genini aktive etmesiyle; testiste hücre farklılaşması, çoğalması, migrasyonu ve vaskülarizasyonu sağlanır. Bununla birlikte, *SOX9* geni duplikasyonunun, XX karyotipli seks reversala neden olabildiği ve testis farklılaşmasını, *SRY* yokluğunda dahi sağlayabildiği de gösterilmiştir (14).

2.3.3. Steroidogenic factor/NR5A1; Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 geni (*SF1* geni)

SF1 geni, 9. kromozomun q33 lokusunda bulunmakta ve nükleer reseptör süper ailesine benzeyen 461 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır. Nükleer hormon reseptör ailesi; steroid hormonlar, tiroid hormonları, vitamin D ve retinoidlerin de içinde bulunduğu farklı ligandların etkilerine aracılık eden, gene özgün transkripsiyon faktörlerinin bir grubudur.

SF1 geni, hipotalamik-pitüiter-gonadal eksen ve adrenal kortekste cinsiyet farklılaşmasında endokrin fonksiyonun anahtar bir düzenleyicisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Leydig hücrelerinden testosteron salınmasını ve primordial germ hücrelerinin testise farklılaşmasını sağlamaktadır (11).

DAX1 geni duplike olduğunda, *SF1* genini inhibe edebilmekte ve bu yolla da gonadal disgeneziye neden olabilmektedir. *SF1* geniyle ilgili çalışmalar, bu genin üreme sisteminin birçok basamağında aktif olduğunu, gonadal ve adrenal bez gelişiminde ve ayrıca seks hormonlarının da içinde olduğu bazı hormonların sentezinde rol oynadığını göstermiştir (11).

İnsanda *SF1* geninin 69 farklı nokta mutasyonu bildirilmiştir. Bu mutasyonların bir kısmının adrenal yetmezlik olmadan primer amenore, overyen yetmezlik ve seks reversala neden olduğu gösterilmiştir (13). *SF1* geninde mutasyon tespit edilen, seks reversal olguların çoğunda şüpheli genitalya görüldüğü, komplet seks reversallı olgularda ise adrenal yetmezliğin eşlik ettiği bildirilmiştir (16, 17). Bizim çalışmamız, adrenal yetmezlik bulgusu olmayan, komplet seks reversal olgularda yapılmış ve şüpheli genitalya dışlama kriteri

olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, bu çalışmada *SF1* geninin araştırılması planlanmamıştır.

2.3.4. Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1 (*NR0B1*, *DAX1*) geni

Seks reversal etiyolojisinde genlerden biri olan *DAX1* geni, X kromozomunun p21.3 lokusunda bulunmakta ve özellikle over gelişimi üzerinde etkili olmaktadır. *DAX1* geni, nükleer hormon reseptör ailesinden olan, 470 amino asitlik bir proteini kodlar ve N- terminal ucu DNA bağlayıcı domain, C- terminal ucu nükleer hormon reseptör ligand-bağlayıcı domain içermektedir. Yapılan çalışmalarda, SRY geni intakt olup Xp'de parsiyel duplikasyonu olan, 46,XY seks reversal ve şüpheli genitelyalı olgular bildirilmiştir (15). 46,XY karyotipli olgularda *DAX1* duplikasyonu dozaj duyarlı seks reversala neden olmakla birlikte, bu genin delesyonları XY karyotipli erkeklerde cinsiyet gelişiminde problem yaratmamaktadır. XX karyotipli olgularda *DAX1* geninin duplikasyonu izole gonadal disgenezi, mental retardasyon ve dismorfik görünüme; *DAX1* geninin fonksiyon kaybı ise, konjenital adrenal hipoplazi ve hipogonadotropik hipogonadizme neden olabilmektedir (12,15). Farelerde *Dax1* geninin, her iki cinsiyette de embriyolojik gelişimde, adrenal ve hipotalamik fonksiyonda etkili olduğu gösterilmiştir (15).

2.3.5. Wingless-type MMTV integration site family, member 4 geni (*WNT4*) geni

WNT4 geni, 1 kromozomun p35 lokusunda bulunan 7 ekzonlu bir gendir (18). *WNT4* geni, erkek cinsiyet farklılaşmasını baskılayan, cinsiyet gelişiminde parakrin etkiye sahip moleküller sekrete eden *WNT* gen ailesinin üyesidir (18). *WNT* proteinleri hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak, intraselüler sinyal yolağını aktive etmekte ve hedef genlerde transkripsiyonel aktivasyonu sağlamaktadır. Vainio ve ark.'nın, *Wnt4* geni inaktive edilen (knock-out) farelerde yaptıkları çalışmada erkek ve dişi farelerde böbrek gelişim defektlerinin ve adrenal fonksiyon bozukluğunun eşit derecede olduğunu; gonadal ve steroidogenik fonksiyonların ise, özellikle dişilerde erkeklere göre artmış olduğunu gözlemlemişlerdir. Vainio ve ark., *Wnt4* geni inaktive edilen dişi farelerde maskülinizasyon ve wolffian kanalların görülmesi ile steroidogenik enzimlerin bu farelerde baskılanmadığını göstermiştir. Bu steroidogenik enzimler, testosteron üretiminde gerekli olan ve normalde overde baskılanması beklenen enzimlerdir. XX karyotipli farelerde, *Wnt4* geninin *Dax1* genini stimüle ettiği ve böylece steroidogenik enzimleri inhibe ettiği gösterilmiştir (18).

WNT4 geni, XX karyotipli bireylerde *DAX1* genini stimüle ederek testis oluşumunu engellemektedir. XY karyotipli bireylerde, *SRY* geni varlığında *WNT4* geni baskılanmakta ve testis oluşumu görülmektedir. Bazı çalışmalar, *WNT4* geninin over gelişiminde önemli olduğunu göstermektedir. *WNT4* geninin aşırı ekspresyonunda *DAX1* aktivasyonuna bağlı olarak, XY dişi fenotip görülmektedir.

WNT4 genini de içeren 1p35 duplikasyonlu 46,XY gonadal disgenezili olgular bildirilmiştir (18).

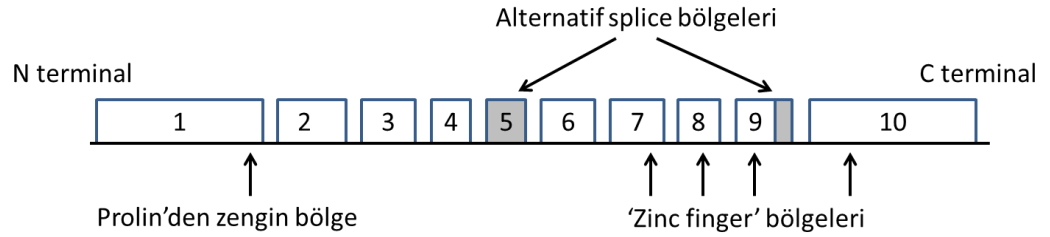
Primer amenore, mülleryan kanal yokluğu, unilateral böbrek agenezisi ve androjen fazlalığı ait bulguları olan bir olguda, *WNT4* geninde heterozigot mutasyonu görülmüştür (19). Bir başka çalışma, *WNT4* mutasyonunun hiperandrojenizm olmaksızın mülleryan anomaliye neden olmadığını göstermiştir. Söz konusu çalışmada primer amenore ile başvuran 46,XX karyotipe sahip, normale yakın dişi fenotip izlenen ve sadece birinde hiperandrojenizm bulunan 28 hastada, *WNT4* geninde mutasyon analizi yapılmış ve mutasyon, hiperandrojenizmi olan tek bir olguda tespit edilmiştir (19). Bu çalışma, Clement-Ziza ve ark.'nın daha önce yaptığı ve *WNT4* geninin hiperandrojenizm olmadan mülleryan kanal anomalisine (Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser=MRKH) neden olamayacağını bildirdiği çalışmayı desteklemiştir (20).

2.3.6. *WT1* geni (Wilms Tümör 1)

Wilms tümör geni, 11. kromozomun q13 lokusunda bulunmakta, nefroblastların ve gonadal dokuların çoğalması ve farklılaşmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. *WT1* geni, iki alternatif splice'ın varlığına ya da yokluğuna göre, 4 farklı transkript kodlayan 10 ekzon içermektedir (21). Splice 1 ayrılmış bir ekzondan (5.ekzon) oluşmakta ve prolinden zengin amino ucu ile zinc finger domainler arasına giren 17 amino asiti kodlamaktadır. (22). Ekzon 9'un sonunda bulunan alternatif splice, donor site olarak kullanıldığında, lizin (K), treonin (T), ve serin (S) aminoasitlerinin, zinc finger 3 ve 4'ün arasına girmesi ile

sonuçlanmaktadır ve bu zinc finger bölgesinin nükleik asitlere bağlanmasını etkilemektedir (Şekil 2.5).

WT1 geninin zinc finger 3 ve 4 bölgeleri arasında; K, T ve S aminoasitleri bulunuyorsa, +KTS izoformu; bulunmuyorsa –KTS izoformu olarak oluşmaktadır (23). Bilinen tüm *WT1* izoformları (izoform1-4), DNA/RNA bağlanması için gereken dört C-terminal ‘zinc finger’ı ve N-terminal Pro/Glu zengin bölge içermektedir (Şekil.2.6).



Şekil 2.5. *WT1* geninin yapısı

17 aa/KTS		
İzoform 1	-/-	1 2 3 4 6 7 8 9 10
İzoform 2	+/-	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
İzoform 3	-/+	1 2 3 4 6 7 8 9 10
İzoform 4	+/+	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
		5' 3'

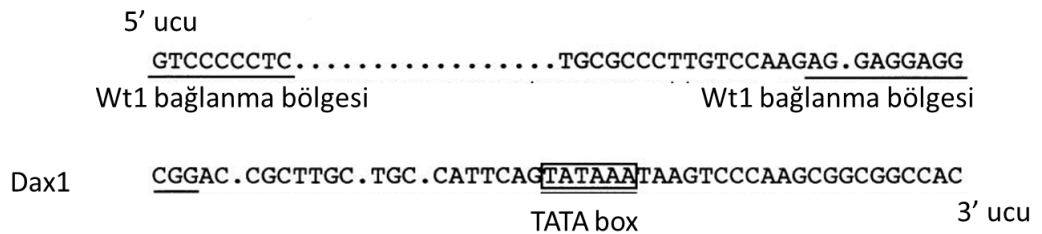
Şekil 2.6. *WT1* geninin izoformları

WT1 geni, gonadların ve böbreklerin oluştuğu, ürogenital kabarıklıkta, *SRY* geninden daha önce eksprese edilmeye başlar. –KTS izoformu, esas olarak

sertoli hücrelerindeki AMH'nin (Antimülleryan Hormon) transkripsiyonel aktivasyonunda rol almaktadır. +KTS izoformunun ise insanda RNA işlenmesi ve farede in vivo *Sry* regülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (23).

–KTS izoformu özellikle DNA'ya bağlanırken, +KTS izoformu RNA'ya bağlanma eğilimindedir (24). XY karyotipli olgularda, *Wt1* (+KTS) homozigot mutant farelerde ve Frasier sendromunda olduğu gibi, *Wt1* (+KTS) geni yokluğunda; küçük gonadlar izlenmekte ve testis gelişiminde gerekli olan pre-sertoli hücre miktarının az olduğu görülmektedir (24).

WT1 geninin, büyümeyi düzenleyen ve hücre farklılaşmasında rol alan birçok gen için güçlü bir transkripsiyonel baskılayıcı ya da aktivatör olduğu bildirilmiştir (25). Farelerde *Dax1* geninin duplikasyonunda, seks reversal görülmekte ve *Wt1*'in, *Dax1* promotor bölgesi üzerine aktive edici etkisi bulunmaktadır. *Wt1*'in, *Dax-1* TATA-box'ın 5' bölgesinde lokalize olan, G-C zengin bağlanma bölgelerine bağlanarak, *Dax1* geninin promotorunu aktive ettiği çeşitli hayvan deneyleriyle (Footprinting analizler, transient transfections, promotor mutajenez ve mobility shift deneyleri vb.) gösterilmiştir (Şekil 2.7) (25).



Şekil 2. 7. *Dax1* geni TATA-box bölgesinin 5' ucunda yer alan yer alan G-C zengin *Wt1* bağlanma bölgeleri

SF1 geninin erkeklerde, Mülleryan İnhibisyon Faktör (MIF) ekspresyonunu sağlayarak cinsiyet gelişiminde rol aldığı bilinmektedir. *WT1*, *SF1* ile sinerjistik bir etki göstererek MIF ekspresyonunu sağlamaktadır (25).Yapılan fare deneylerinde *Sf1* geninin promotörü üzerinde 4 adet *Wt1* bağlayıcı bölge olduğu ve bu bölgelerin gonadlarda aktif gen ekspresyonunu sağladıkları bildirilmiştir (25).

WT1 geninin yanlış anlamlı (missense) mutasyonları; gonadal disgenezi, eksik maskülinizasyon, erkek psödohermofroditizmi, 46,XY seks reversal ve renal anomalilerin görüldüğü Denys Drash Sendromu, Frasier Sendromu ve Wilms tümör sıklığında artışa neden olmaktadır (11).

2.3.7. *ATRX* geni (Alfa Talasemi Mental Retardasyon Sendromu X'e bağlı/ X'e bağlı nüleer protein geni)

ATRX geni, X kromozomunun q13.3 lokusunda bulunmakta ve 36 ekzon içermektedir. ATPaz/ helikaz ailesinin alt grubu olan "Sucrose nonfermenting 2 like" (SNF2-like) ailesinin üyesi olup, transkripsiyonel regülasyon, DNA onarımı ve kromozom segregasyonundan sorumlu olan "X'e bağlı nükleer protein" (X-linked nuclear protein=XNP) isimli proteinin sentezini sağlamaktadır (26). Bu genin mutasyonu, X'e bağlı alfa talasemi mental retardasyon sendromunda tanımlanmıştır. Özellikle gelişmekte olan beyin dokusundaki ekspresyonu ve nöron farklılaşmasıyla ilişkili olması, mutasyonunda söz konusu genin mental retardasyon görülmesini açıklamaktadır (27).

ATRX genindeki missense mutasyonlar ve küçük delesyonlar; inmemiş testisten, erkek psödohermofroditizmine kadar izlenebilen ürogenital anomalilere neden olmakla birlikte, *ATRX* geninin cinsiyet gelişimindeki rolü hala tam olarak anlaşılamamıştır (28). Yapılan farklı çalışmalarda ‘Alfa Talasemi Mental Retardasyon’lu hastalarda, sertoli hücreleri ve wolfian kanalların var olduğu gösterilmiştir. *ATRX*’in cinsiyet gelişimindeki fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, prematür leydig hücrelerini etkilediği ve matür leydig hücre oluşumunu engellediği düşünülmektedir (28).

ATRX geni mutasyonlarında ciddi mental retardasyon, genitoüriner anomaliler ve alfa talasemi olmadan da görülmektedir (29). Bu nedenle hastalarımızın dahil olma kriterlerine yazılmamış olmakla birlikte mental retardasyonu olmayan hastalar seçildiği için bu çalışmada *ATRX* geni çalışma kapsamına alınmamıştır.

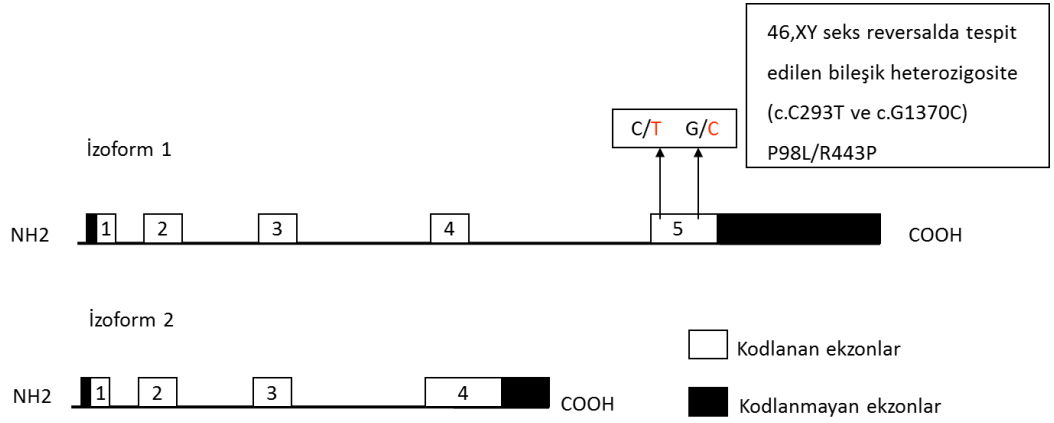
2.3.8. Chromobox Homolog Protein 2 (*CBX2*)Geni (17q25)

İnsanda *CBX2* geni, farelerdeki homologu *M33* geni, 17. kromozomun üzerinde q25’de lokalize, 2 izoformlu ve 5 ekzonlu bir gendir (Şekil.2.7). *CBX2*, “Polycomb group (PcG) protein” yapısında bulunan bir proteini kodlamaktadır. PcG proteinleri, meyve sineğinde *Hox* (homeobox) geninin transkripsiyonunun baskılanmasında rol alan bir grup protein olarak tanımlanmıştır. Omurgalılarda PcG proteinleri 2 farklı “kromatin ilişkili kompleks”in bir araya gelmesiyle oluşmakta ve bu yapılar “Polycomb-Repressive Complex 1 (PRC1)” ve “Polycomb- Repressive Complex 2 (PRC2)” olarak isimlendirilmektedir. PRC1

dört adet çekirdek alt grubu bulundurmaktadır. Bu çekirdeklerden birini, Chromobox Homolog Protein'lerden (*CBX2*, *CBX4*, *CBX6*, *CBX7* ya da *CBX8*) biri oluşturmaktadır. PRC'nin diğer alt grupları; Ring Finger Protein (RING), Polyhomeotic Homolog (PHC), B hücre spesifik Moloney Mürin Lösemi Virüs Entegrasyon Site 1 (BMI/MEL18)'dir. PRC1 ve PRC2, metile histonların doğru tanınmasıyla epigenetik gen regülasyonu ve histonların metilasyonundan sorumludur. *CBX2* proteininin de içinde olduğu *CBX* ailesi, chromodomain yapı içermekte ve bu ailenin metile histonların tanınmasında rol aldığı düşünülmektedir (30).

Yapılan fare deneylerinde; *Cbx2* geninin, *Sf1* ve *Sry* üzerinde stimule edici bir etkisi olduğu ve *Cbx2*'nin mutant olduğu durumlarda söz konusu genlerin fonksiyonlarının azaldığı gösterilmiştir. *Cbx2* geninde deneysel olarak mutasyon oluşturulan (knock out) fareler üzerinde yapılan deneylerde, iskelet sistemi ve adrenal bezde anomalilere neden olduğu gösterilmiştir. Farelerde yapılan deneylerin sonucundan yola çıkarak, insanda *CBX2* geninin, 46,XY karyotipli bireylerde ovaryen gelişimi baskılayan bir fonksiyona sahip olduğu düşünülmüştür. Seks reversalin etiyolojisinde, *CBX2* genindeki fonksiyon bozukluğunun da etkili olduğu, 46,XY dişi fenotipe sahip bir olgu ile insanda ilk kez gösterilmiştir. Bu durum, ileri maternal yaş nedeniyle yapılan prenatal karyotipleme ile elde edilen sonucun doğumdaki cinsiyet fenotipi ile farklı olması sonucu ortaya çıkmıştır. 46,XY karyotip olduğu bilinen bu hastada, postnatal dişi fenotip görülmesi nedeniyle yapılan *SRY* geni dizi analizinde, herhangi bir mutasyon bulunmamıştır. Daha sonra, diğer etkili genler çeşitli yöntemlerle ekarte

edilmiş ve anne, baba ve çocuk çalışması ile *CBX2* geninde hastada bileşik (compound) heterozigosite olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.8) (31). Bu olgu ile seks reversallı hastalarda, *CBX2* geninin etiyojiden sorumlu olduğu ortaya çıkmış ve bu sonuç daha önce fareler üzerinde söz konusu gen için yapılan çalışmaların sonuçlarını desteklemiştir (30).



Şekil 2. 8. CBX2 geninin yapısı ve izoformları

2.3.9. Cinsiyet Gelişiminde Etkisi Olan Diğer Genler

***DMRT1* geni** (Doublesex and mab-3 related transcription factor 1) (9p24.3)

DMRT1 geni, 9. kromozomda p24.3 lokusunda bulunan, 5 ekzonlu bir gendir. Zinc finger like DNA-binding domain içermekte ve transkripsiyonel bir düzenleyici olarak görev yapmaktadır (34). *Dmrt1* geni, omurgalı canlılarda cinsiyet farklılaşmasında etkilidir ve sinekler ile nematodlarda erkek cinsiyet gelişiminde anahtar düzenleyici olarak görev yapmaktadır (32).

Dax1 geninin, memelilerde *Sry* geni ile başlayan cinsiyet farklılaşma kaskadında rol aldığı hayvan deneyleri ile gösterilmiştir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalara dayanarak, insanda *DMRT1* genindeki haploid yetersizlik ile seks reversal görülebileceği düşünülmektedir (32). 9. kromozomun p24 lokusunun delesyonlarında seks reversal görülen olgular bildirilmiş ve bu bölgede bulunan *DMRT1* geninin bu olgulardaki seks reversalin etiyolojisinden sorumlu olduğu öne sürülmüştür. İnsanda yapılan immunohistokimyasal çalışmalar, *DMRT1* geninin, testiste sertoli hücreleri, spermatogonya ve spermatositlerde bulunduğunu göstermiştir (33).

Desert hedgehog (*DHH*) geni (12q13.12)

Hedgehog gen ailesinin bir üyesi olan “Desert hedgehog (*DHH*)” geni, 12. kromozom q13.12’de lokalize olup 396 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır (34). *DHH* geni, sertoli hücrelerinde eksprese olarak, fetal testiste steroid üreten leydig hücrelerinin farklılaşmasında pozitif düzenleyici bir etki göstermektedir. Hayvan deneylerinde *Dhh* geninin testis kordlarının oluşumunda ve peritübüler myoid hücrelerin farklılaşmasında rol oynadığı gösterilmiştir (34). *DHH* geninin transkripsiyonu, *SRY* geninin ekspresyonundan sonra başlamakta ve gonadal farklılaşmada önemli bir rol oynamaktadır. *DHH* geninin heterozigot ve homozigot mutasyonlarının gonadal disgeneziye neden olduğu bildirilmiştir (34).

Mitogen activated protein kinase kinase kinase 1 (*MAP3K1*) geni
(5q11.2)

MEK/ERK sinyal yolağının bir üyesi olan *MAP3K1* geni, 5. kromozonun q11.2 bölgesinde lokalize 20 ekzonlu bir gendir (34). MAPK (Mitogen activated kinase) kaskadları hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında anahtar düzenleyici rol oynamaktadır ve kanserlerle ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarla da gösterilmiştir. Farelerde yapılan çalışmalarda *Map3k1* geninin, gonadal farklılaşma döneminde embriyonik gonadda eksprese olduğu gösterilmiştir. 46,XY gonadal disgenezisi olan 2 ailesel ve 11 sporadik olguda bağlantı analizi ile *MAP3K1* geninin ilişkisini bildirmiştir (34).

Fibroblast growth factor 9 geni (*FGF9*) (13q11.13)

FGF9 geni, Fibroblast Growth Factor (FGF) gen ailesinin bir üyesidir ve diğer üyeler gibi mitojen ve hücre migrasyonu gibi aktivitelere sahip 3 ekzonlu bir gendir (34). Colvin ve ark. (2001) tarafından farelerde yapılan deneylerde *Fgf9* geninin homolog olarak mutant olduğu durumlarda seks reversal fenotipe yol açtığı görülmüştür. Seks reversallı hastalarda yapılan çalışmalarda *FGF9* mutasyonu bildirilmemekle birlikte, fare deneylerine dayanarak, *FGF9*'un insanda da testisin embriyolojik gelişiminde etkili olabileceği, araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür (34).

FOX L2 geni (Forkhead box L2)(3q23)

FOX L2 geni, tek ekzonlu bir gendir ve mutasyonları “Blefarofimozis epikantus inversus sendromu (BPES)” ve prematür overyen yetmezliğe neden olmaktadır (34). Ayrıca, BPES görülmeyen non sendromik prematür overyen yetmezliğe neden olduğu da bildirilmiştir. Erkek BPES hastalarında ise testis gelişimi etkilenmemektedir (35)

Foxl2 geninin fare overlerinde granülosa ve germ hücrelerinde eksprese olduğu gösterilmiştir (11). Fare ve tavuklarda, *Foxl2* geninin homozigot mutasyonunda seks reversal izlenmemiştir. XX interseks sendromlu boynuzsuz keçilerde, *Foxl2* geninin transkripsiyonunu etkileyen bir delesyon saptanmıştır (11). Bu çalışmalar keçi dışındaki vertebralılarda *Foxl2* geninin cinsiyet gelişimindeki etkisinin, dozaj ya da farklı etkilerle maskelendiğini düşündürmektedir. *FOX L2* geninin dişi cinsiyet gelişimindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir (11).

Farelerde yapılan ve *Foxl2*’nin aromataz gen ekspresyonunda regülatör rol oynadığını öne süren çalışmalar olduğu gibi, insanda FSH (Foliküler stimüle edici hormon) sentezini düzenlediği bilinen Activin A’yı indüklediği ve bu şekilde FSH sekresyonunu artırdığını gösteren çalışmalar da vardır (36). Tran ve ark. (2013) tarafından, *Foxl2* knock-out farelerde hem erkek hem dişide FSH düzeylerinin düşük olduğu gösterilmiş ve bu deneylerden yola çıkılarak insanda da FSH salınımı için *FOX L2* geninin gerekli olduğu öne sürülmüştür (37).

2.4. Cinsiyet Gelişim Anomalileri

Cinsiyet gelişim anomalileri, şüpheli genitalyadan komplet seks reversala kadar geniş bir yelpazede karşımıza çıkmaktadır.

2.4.1. Şüpheli Genitalya

Şüpheli genitalya; cinsiyetin, dış genital yapılara bakılarak tanımlanamadığı durumları ifade etmektedir. Şüpheli genitalya hastalarını değerlendirirken, annenin gebelik hikayesi ve gebelikte ilaç kullanımı detaylı sorgulanmalı ve 3 kuşak aile ağacı çizilmelidir. Şüpheli genitalya olan hastalarda kromozom analizi ve gerekiyorsa “Florasana İn Situ Hibridizasyon (Fluorescent In Situ Hybridization=FISH)” tekniği kullanılarak karyotipik cinsiyet belirlenmelidir. Ayrıca, pelvik ultrasonografi, kanda; sodyum, potasyum, testosteron ve plazmada 17-OH-progesteron seviyelerinin ölçümü yapılmalıdır (38).

46,XX karyotipe sahip şüpheli genitallyalı hastalarda, Konjenital Adrenal Hiperplazi (KAH) en sık görülen durumdur. Tuz kaybettiren KAH tipi olup olmadığının ayırıcı tanısı; 11 deoksikortizol, androstendion, testosteron, renin, aldosteron ve 24 saatlik idrar kromatografisi ile acil olarak yapılmalıdır (38).

Şüpheli genitallyası olan 46,XY hastaların ancak %25’inde spesifik bir etiyolojik tanıya gidilebilmektedir. 17 beta hidroksisteroid dehidrogenaz (17 β -HSD) ve 5 alfa redüktaz eksikliği gibi androjen biyosentez defektleri, kanda testosteron, androstenedion ve dehidrotetosteron (DHT) seviyelerinin ölçümü ile tespit edilebilmektedir. Plazmada; 17-OH-progesteron, kanda; testosteron,

androstendion, DHT, dehidroepiandrosteron ve 24 saatlik idrarda steroid profili ölçülmektedir. Bazı laboratuvarlarda AMH ve inhibin B seviyeleri de bakılabilmektedir (38).

Şüpheli genitalya izole olarak izlenebildiği gibi, birçok sendroma da eşlik edebilmektedir. Bu sendromlardan klinikte en sık görülenleri aşağıda açıklanmaktadır.

2.4.1.1. Konjenital adrenal hiperplazi (KAH)

Konjenital Adrenal Hiperplazi, 1/12000- 1/15000 canlı doğumda görülen, adrenal kotekste yer alan ve kortizol biyosentezinde görevli olan, enzimlerin eksikliği ile ortaya çıkan otozomal resesif (OR) bir durumdur (38). KAH'nin en yaygın formu, 6. kromozomun kısa kolunda lokalize 21 hidroksilaz (Cytochrome p450, Family 21, Subfamily a, Polypeptide = *CYP21A2*/ P450c21) genindeki mutasyon nedeniyle, adrenal steroid 21 hidroksilaz enziminin kodlanamaması sonucu oluşmaktadır. Bu enzim kortizol ve aldosteron öncülü olan, 17 alfa hidroksiprogesteronu ve progesteronu sırasıyla; 11 deoksikortizole ve deoksikortikosterona dönüştürmektedir. KAH'nin %95'inden bu enzim defekti sorumludur. Kortizol sentezinin bloke olması, ACTH (Adrenocorticotropic hormon) salınmasına yol açar ve adrenal korteks ACTH ile uyarılır. Böylece kortizol öncülleri birikmekte ve seks hormon biyosentezinde farklı yöne kayma olduğu görülmektedir. Mutasyon taşıyıcı sıklığı 1/50 olan *CYP21A2* geninde 169 mutasyon bildirilmiştir (13, 38).

11 beta hidroksilaz (*CYP11B1*) eksikliği, 17 alfa hidroksilaz eksikliği ve 3 beta hidroksisteroid dehidrogenaz eksikliği, kortizol ve seks steroid üretiminin bozulması ile şüpheli genitalyanın olduğu daha nadir görülen durumlardır (38).

Yenidoğan kızlarda klasik ya da ciddi virilizan KAH'nin ana görünümü şüpheli genitalyadır. Eğer tanı hemen konulup tedavi edilmezse, hem kız hem de erkek çocukta postnatal hızlı büyüme olmakta ve erken puberte gelişmektedir. Ciddi enzim defekti olanlarda ise neonatal tuz kaybı ve ölüm görülmektedir. Tanı, 17 hidroksiprogesteronun(17-OH progesteron) kanda yüksek düzeyde saptanması ile konulmaktadır. Tanı açısından şüpheli olgularda ACTH uyarı testi yapılmaktadır. Kesin tanı mutasyon analizi ile konulmaktadır.

2.4.1.2. Smith-Lemli-Opitz (SLO) Sendromu

7- dehidrokolesterol redüktaz enzim eksikliğine bağlı OR bir sendromdur. Büyüme ve gelişme geriliği (%85), mental retardasyon (%97), mikrosefali (%80), yarı damak (%51), blefaropitozis (%69), anteverte nares (%80), ayakta 2. ve 3. Parmaklar arasında sindaktili (%85), konjenital kalp hastalığı (%50), hipospadias, mikropenis ve şüpheli genitalya gibi genital anomaliler (%74) görülmektedir (38). 46,XY karyotip ve normal *SRY* geni dizi analizine rağmen bu hastalarda, hipospadiastan dışı dış genitalya yapısına kadar geniş bir klinik spektrum izlenebilmektedir. Bu hastalarda düşük virilizasyonun mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte, düşük kolesterol seviyesi ve kolesterol öncüllerinin artışı nedeniyle, fetal testosteron salınımının azalmasına bağlı olduğu

düşünülmektedir (39). Bu hastalarda biyokimyasal olarak 7 dehidrokolesterol seviyesinin arttığı görülmektedir (34).

2.4.1.3. Kamptomelik displazi

SOX9 geninin mutasyonuna bağlı ve sıklıkla de novo görülen otozomal dominant (OD) bir sendromdur. Klinik olarak; femur ve tibiada yay görünümü (bowing), dar göğüs kafesi, kısa birinci metakarpaller ve hastaların %75'inde komplet ya da inkomplet olarak, 46,XY seks reversal izlenebilmektedir (40). Kamptomelik displaziye yarık damak çok sık olarak eşlik etmekte ve olguların 1/3'ünde konjenital kalp defekti görülmektedir (38).

2.4.1.4. WAGR (Wilms tümör, aniridi, genitoüriner anomaliler, mental retardasyon)

11. kromozomun p13 bölgesinin mikroskobik ya da submikroskobik delesyonu sonucu oluşan, Wilms tümör (%57), aniridi (%98), genitoüriner anomaliler (%75), mental retardasyon (%72) birlikteliği ile görülen bir “komşu gen” (contagious gen) sendromudur (41). 46,XY karyotipli olan bu hastalarda sıklıkla kriptorşidizm ya da hipospadias ve nadiren şüpheli genitalya görülmektedir. WAGR sendromunda komplet seks reversallı bir olgu da bildirilmiştir (42). WAGR sendromlu olgulara spesifik FISH problemleri ile 11. kromozomun p13 bölgesindeki delesyonun gösterilmesi ile kesin tanı konulmaktadır (38).

2.4.1.5. Drash sendromu/ Wilms tümör ve psödohermafroditizm

WT1 gen mutasyonuna bağlı olarak görülen; şüpheli genitalya, erkek psödohermafroditizmi, XY gonadal disgenezi, gonadoblastom, erken başlangıçlı hipertansiyon, proteinüri ile giden nefrotik sendrom, nefropati, nefroblastom, renal yetmezliğe giden mezengial sklerozun birlikte bulunabildiği bir sendromdur (38). Böbrek yetmezliğine bağlı olarak, ortalama yaşam süresi 3 yıldır. otozomal dominant kalıtım modeli gözlenmekle birlikte çoğunlukla sporadik olarak görülmektedir (34).

2.4.1.6. Frasier Sendromu

Drash sendromuna benzer şekilde, şüpheli genitalya, erkek psödohermafroditizmi, gonadal disgenezi, proteinüri, nefropati, nefrotik sendrom, diffüz mezengial skleroz, glomerülopati, fokal segmental glomerüloskleroz, kronik böbrek yetmezliği izlenen ve Drash sendromuna göre Wilms tümörü sıklığı daha az olan ancak gonadoblastom riski yüksek olan bir sendromdur. *WT1* genindeki “alternatif splicing” defektine neden olan dominant mutasyonlara bağlı olarak genellikle sporadik olarak ortaya çıkmaktadır (34,38).

2.4.1.7. 5-Alfa-Redüktaz eksikliği

5-alfa-redüktaz (5-AR) enzimi, testosteron biyosentez yolağında testosteronun daha potent bir androjen olan dihidrotestosterona (DHT) dönüşmesini sağlayan bir enzimdir. 5 alfa-redüktaz enzimini kodlayan *SRD5A2*

(Steroid 5-alpha-reductase-2 gene) geni 2. kromozomda p23 bandında bulunur (34).

DHT, serumda düşük seviyelerde bulunan testosteronun etkisini artırarak, erkekte dış genitalyanın normal maskülinizasyonunu sağlamaktadır. 5 alfa redüktaz enzim eksikliği (5-ARD), otozomal resesif, geçiş gösteren bir hastalık olup, ‘psödovajinal perineoskrotal hipospadias’ ya da pubertede primer amenore, meme gelişimi olmaması ile bulgu vermektedir (38). Psödovajinal perineoskrotal hipospadias (OMIM 364600), 46,XY erkeklerde görülen, doğumda şüpheli genitalya ve kör perineal poşun olduğu, pubertede maskülinizasyonun görüldüğü bir psödohermafroditizmdir. Bu hastalarda mikropenis, perineal hipospadias, bifid skrotum, ürogenital sinüs izlenebilmektedir (38).

2.4.1.8. 17 β -Hidroksisteroid Dehidrojenaz (17 β -HSD) Eksikliği

17 β -HSD enzimi, fetal testiste, androstenodionun testosterona dönüşümünü sağlamaktadır. Hidroksisteroid dehidrojenaz (*HSD17B3*) geni mutasyonlarında bu enzimin eksikliği görülmekte ve klinik olarak erkek psödohermafroditizmi ve jinekomasti ile sonuçlanmaktadır (34, 38). Bu bulgular testosteron miktarının düşük olması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. 17 β -HSD eksikliğinin tanısı, plazmada azalmış testosteron/androstenedion oranının görülmesi ile konulmaktadır.

2.4.1.9. Androjen Duyarsızlık Sendromu (ADS)/ Testiküler Feminizasyon

Androjen duyarsızlık sendromu (OMIM 300068), X kromozomunun p22 bandında lokalize olan, Androjen Reseptör (AR) geni mutasyonları ile oluşmaktadır. X'e bağlı resesif kalıtım görülen bu sendromda normal 46,XY karyotip ile, dışı dış genitalya, meme gelişimi, kör vajen, uterus yokluğu, ve abdominal ya da inguinal testis görülebilmektedir (34). ADS'lı hastalarda AMH normal aktivite gösterip, uterus ve vajenin üst 1/3'lük kısmın gelişmesi engellenirken, vajenin 2/3'lük alt kısmı gelişmekte ve kör vajen oluşmaktadır.

2.4.1.10. Parsiyel Androjen Duyarsızlık Sendromu (PADS)

Parsiyel androjen duyarsızlık sendromu (OMIM 312300), Androjen Reseptör (AR) geni mutasyonları sonucu görülmektedir. AR geni X kromozomunun p22 bölgesinde lokalizedir. Erkek psödohermafroditizmin bu formunda hipospadias, hipogonadizm, jinekomasti, normal XY karyotip ve pedigreede X'e bağlı resesif kalıtım şekli görülmektedir. Etkilenen erkekler infertildir ve testis biyopsilerinde spermatozoa görülmemektedir. Androjen duyarsızlık sendromu ve Pseudovaginal Perineoscrotal Hypospadias ayırıcı tanısında yer almaktadır (34).

2.4.1.11. Şüpheli genitalyaya neden olan delesyonlar

“Testis determining” genlerden biri olan *DMRT1* geni, 9.kromozomun kısa kolunun distal bölgesinde lokalizedir. Konvansiyonel sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalar ile 9. kromozomun p24.3 bölgesinin delesyonunun gonadal

disgenezi ve 46,XY seks reversala neden olduğu gösterilmiştir (3, 38). 9p delesyon sendromunda; 46,XY gonadal disgenezi, trigonosefali, dismorfik yüz bulguları ve bilişsel yetersizlik bulguları görülmektedir (43).

10q terminal bölgesinin delesyonlarının, anormal erkek dış genital yapı gelişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (3). 10q terminal delesyonu olan olgularda kriptorşidizm, mikropenis, hipospadias, dişi tipte dış genitalya ve mental retardasyon bildirilmiştir (44).

2.4.2. Seks Reversal

Kayotipik cinsiyet ile fenotipik cinsiyetin tamamen farklı olduğu durumlar “Seks reversal” olarak tanımlanmaktadır (38).

2.5.2.1. 46,XX Seks Reversal

46,XX seks reversal 1/20,000 canlı doğumda genellikle aşağıdaki durumlarda gözlenmektedir;

1-SRY taşıyan Y kromozomu parçasının, X kromozomuna translokasyonu sonucu

2- XX, XY mozaizmi bulunan olgularda

3- Gerçek XX hermafroditizm; Kimerizm ya da SRY yolağında bir mutasyon olması sonucu, testis ve over dokularının her ikisinin de bulunması durumunda (38).

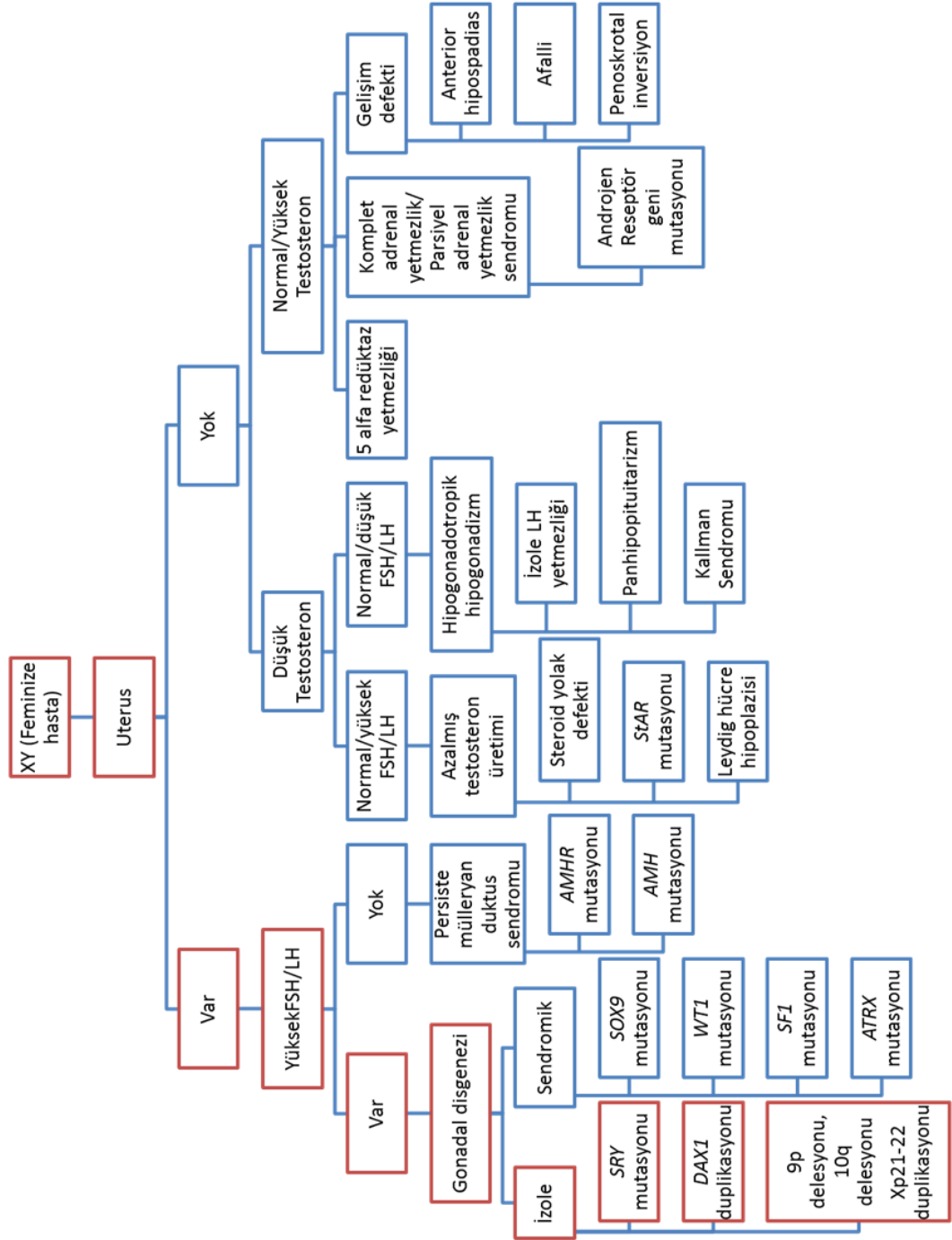
2.5.2.2. 46,XY Seks Reversal

46,XY kromozom yapısına sahip bireyde, kadın fenotip görülmesi durumudur. Aşağıdaki nedenlerle oluşabilmektedir:

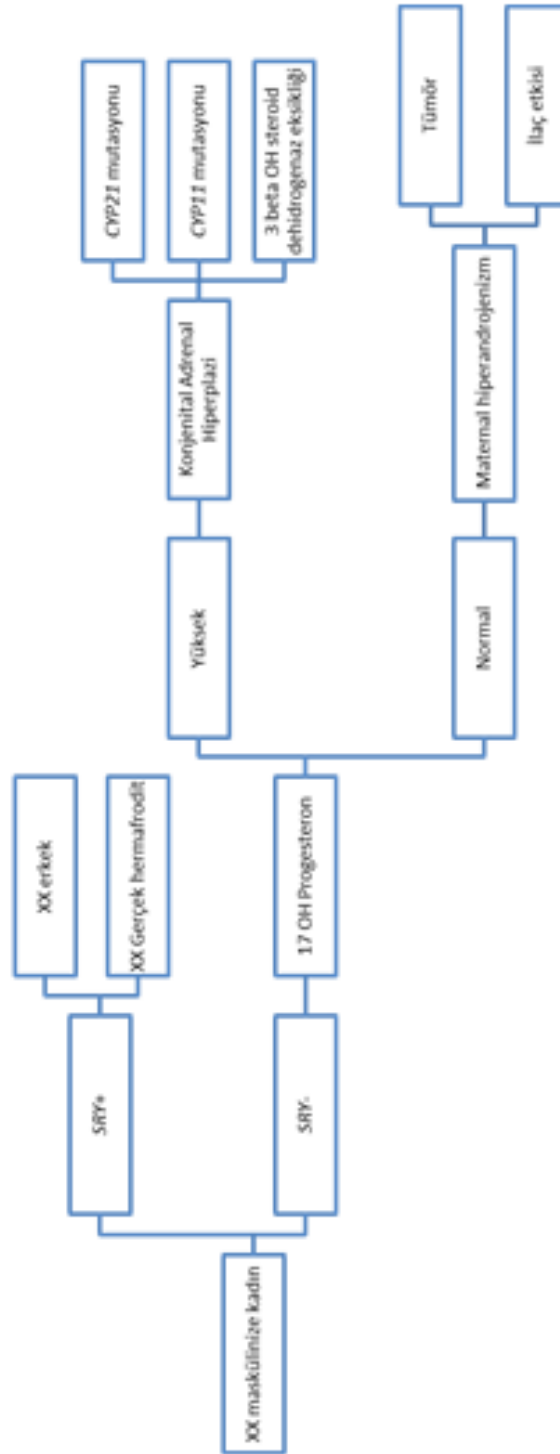
- 1- *SRY* geni mutasyonları ya da delesyonları; 46,XY seks reversalin %15-20'sini açıklamaktadır.
- 2- Tam androjen duyarsızlık sendromu (Testiküler feminizasyon); dış genital yapı tamamen kadın fenotipinde, fakat iç genital yapılar erkek yönünde gelişmektedir.
- 3- Kamptomelik displazi; *SOX9* gen mutasyonu ile oluşmaktadır.
- 4- 9p24 delesyonu
- 5- Xp21.2-p22.2 ve *DAX1* geni (Xp21.3) duplikasyonları
- 6- 10q terminal delesyonu

Gonadal disgeneziye sahip olan 46,XY kadın hastaların %80'inde etiyoloji açıklanamamakta ve bu hastalarda sıklıkla uterus ve streak gonad yapısı izlenmektedir (38).

Seks reversal hastaya genetik yaklaşımda öncelikle fizik muayene, görüntüleme ve laboratuvar tetkikleriyle iyi bir ayırıcı tanı yapıldıktan sonra, sorumlu olduğu düşünülen genetik nedenler Şekil 2.8. ve 2.9'da verilen algoritmalar klavuzluğunda araştırılmalıdır.



Şekil 2.9. XY feminize hastada etyolojik nedenler (11)



Şekil 2.10. XX maskulinize hastada etyolojik nedenler (11)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na primer amenore, infertilite gibi nedenlerle başvurmuş olan ve 46,XY karyotipi saptanan, 0-60 yaş aralığında bulunan dişi fenotipli 10 hasta, çalışma grubuna dahil olma ve dışlama kriterlerine göre, çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışma için Etik Kurul onayı, 09 Mayıs 2012 tarihli Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (Girişimsel Olmayan) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 196 karar numarasıyla alınmıştır. Seçilen hastaların, onam formları ile birlikte, DNA eldesi için kanları EDTA'lı tüplere alınmıştır.

Hasta seçiminde kullanılan dahil olma ve dışlama kriterleri;

Dahil olma kriterleri;

- 46,XY karyotipine sahip olma
- Fenotipin dişi yönünde olması
- *SRY* geninin varlığı
- FSH ve LH seviyelerinin yüksek olması
- Testosteron seviyelerinin dişi cinsiyete göre normal olması
- Uterus varlığı

Dışlama kriterleri;

- 46, XX karyotipine sahip olma
- Fenotipin erkek yönünde olması
- *SRY* geni yokluğu
- FSH ve LH seviyesinin normal olması
- Testosteron seviyesi yüksekliği
- Steroidogenezde görevli enzimlerde yetersizlik olması
- Uterusun yokluğu
- Herhangi bir sendromun eşlik etmesi

Çalışmaya katılmayı ve örnek vermeyi kabul eden hastalardan, EDTA'lı tüplere 2'şer ml periferik kan alınmıştır. Daha önce GÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalına başvurmuş olan iki hasta yeni örnek vermeyi kabul etmemiş (sosyal nedenlerden ötürü) ancak daha önce elimizde bulunan ve araştırma amaçlı kullanım için daha önce onam alınmış, az miktardaki DNA örneğine "Tüm Genom Amplifikasyonu (Whole Genome Amplification=WGA)" yöntemi uygulanarak yeterli miktarda DNA elde edilmiştir.

Hastalara ait DNA'lar ile; sırasıyla *SRY* ve *WT1* genlerinin dizi analizi, sonrasında seks reversala neden olduğu bilinen 9. kromozomun p kolu, 10. kromozomun q kolu terminal delesyonları ve X kromozomunun p21-q22 duplikasyonları gibi submikroskopik kromozomal değişiklikleri saptayabilmek için Array (Affymetrix® Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array) analizi yapılmıştır. Son olarak tüm bu değerlendirmeleri normal olan hastalara *CBX2* geni dizi analizi yapılmıştır.

3.2. DNA İzolasyonu

3.2.1. DNA Eldesi İçin Gerekli Malzemeler

- Otoklavlanmış bidistile su (Applichem®)
- Proteinaz K (20 mg/ml) (Applichem®)
- Lysis tampon (10 mM TrisHCl, 400 mM NaCl, 2 mM Na₂EDTA pH: 8.2) (Applichem®)
- SDS (sodyumdodesil sülfat) (Merck®)
- Amonyum asetat (Merck®)
- Absolü etanol (Riedel-De Haen®)
- TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na₂EDTA pH=7.5) (Applichem®)

3.2.2. DNA Eldesi Yöntemi

DNA'lar "Yüksek Tuz Konsantrasyonlu DNA İzolasyon Yöntemi" ile elde edilmiştir.

- 2,5 ml kan 15 ml'lik steril tüpe alınıp, üzerine 15 ml'ye tamamlayacak şekilde önceden hazırlanmış otoklavlanmış soğuk bidistile su konulmuştur.
- Aşağı yukarı çalkalayarak 2-3 dk hızlı olarak karıştırıldıktan sonra 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atılıp pelletin üzerine tekrar soğuk su ilave edilip santrifüj yapılmış, bu işlem 5 kez daha tekrarlanıp, son boşaltmada tüpler bir kağıt havlunun üzerine ters çevrilip, süzülmesi sağlanmıştır.

- Süzöldükten sonra tekrar çevrilerek üzerine 750 µl nükleolizis buffer, 40 µl Proteinaz K (20 mg/ml), 50 µl SDS konup çalkalanmış ve bir gece 37 °C de bekletilmiştir.
- Ertesi gün 500 µl Amonyum asetat eklenip, aşağı yukarı hızla karıştırılarak 10 dk oda ısısında bekletilmiş ve 3500 rpm de 20 dk santrifüj edilip, üzerindeki süpernatant 15 ml’lik başka bir tüpe aktarılmıştır.
- Tüpün içindeki miktarın iki katı kadar absöü etanol konulup, hafif karıştırılarak içindeki DNA belirginleştirilmiştir.
- Önceden içërisine 150 µl TE konan mikrosantrifüj tüpüne pipet ucuyla alınan DNA konulup, 1 gün oda sıcaklığında bekletilmiş ve çözünmesi sağlanmıştır.
- Çözünmüş olan DNA %1’lik agaroz jelde yürütölmüş ve Nanodrop ND-1000 USA spektrofotometrede ölçölmüşür. OD260/OD280 oranı ve optik dansitesi kaydedilmiştir.
- Çözündükten sonra kullanılıncaya kadar derin dondurucuya kaldırılmışür (-20°C).

3.3. Tüm Genom Amplifikasyonu

Hasta grubuna dahil edilen iki hastanın yeni örnek vermek istememesi nedeniyle hastaların elimizde bulunan az miktardaki DNA örneklerinden ®*Sigma GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification (WGA)* kiti ile kit protokolü kılavuzluğunda tüm genom amplifikasyonu yapılmıştır.

Kit malzemeleri:

- 10XSingle Cell Lysis & Fragmentation Buffer (Sigma®)
- Proteinase K Solüsyonu (Sigma®)
- 1X Single Cell Library Preparation Buffer (Sigma®)
- Library Stabilizasyon Solüsyonu (Sigma®)
- Library Preparation Enzimi (Sigma®)
- 10XAmplifikasyon Master Karışım (Sigma®)
- WGA (Whole genome amplification) DNA polimeraz (Sigma®)
- Kontrol DNA (Sigma®)
- Distile su

Kitin tüm malzemeleri -20°C’de tutularak çalışmanın tüm aşamaları buz üstünde yapılmıştır.

Çalışma 3 basamakta yapılmıştır;

- 1- Lizis ve fragmantasyon
- 2- Omniplex library generation
- 3- PZR amplifikasyonu

Bu basamaklar arasında hiç beklenmemiş ve -20°C’de saklanan DNA kullanılmıştır. Tüm uygulama pozitif kontrol DNA’sı ile birlikte yapılmıştır.

Lizis ve fragmantasyon

- 1- 1 µl DNA örneği PZR tüpü içine konuldu
- 2- Son hacim 9µl olacak şekilde yeterli miktarda su eklendi

2- 32 µl 10X tampon çözelti üstüne 2 µl proteinaz K eklenerek vortex cihazında karıştırıldı

3- Tampon çözeltiden 1 µl DNA örneği üzerine eklenerek iyice karıştırıldı 5-50 °C de 1 saat ve 99 °C de 4 dakika inkübe edildi

4- Spin yapıldı

Library hazırlama;

5- Her örneğe 2 µl 1X single cell library preparation buffer eklendi

6- 1 µl library stabilization solüsyonu eklendi

7- İyice karıştırılarak 95 °C de 2 dk ısı döngüleyicide tutuldu

8- 1 µl library preparation enzim eklenerek karıştırıldı ve santrifüj yapıldı

9- Isı döngüleyici (Termal cyclers) aşağıdaki şekilde programlandı (Tablo 3.1)

10- Santrifüj yapılarak amplifikasyon aşamasına geçildi

Tablo 3.1. Isı döngüleyicide uygulanan amplifikasyon programı

Sıcaklık	Süre
16 °C	20 dakika
24 °C	20 dakika
37 °C	20 dakika
75 °C	5 dakika
4 °C	Bekleme

Amplifikasyon aşaması;

13-14 µl lik karışıma 7,5 µl 10X amplifikasyon master karışımı, 48,5 µl su, 5 µl WGA DNA polimeraz eklenerek iyice karıştırıldı

14- GeneAmp 9700 PCR system (Applied biosystems USA) termal döngü cihazına konulan örnekler Tablo 3.2’de gösterilen program uygulandı

Tablo 3.2. Isı döngüleyicide uygulanan amplifikasyon programı

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
95 °C	4 dakika	1
94 °C	30 saniye	
65 °C	5 dakika	25
4 °C	Bekleme	

Elde edilen ürün -20 °C de sekans ve array çalışmaları yapılana kadar tutuldu.

3.4. DNA Dizi Analizi

3.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Eldesi

Çalışma grubuna dahil edilen hastaların DNA örneklerinde yapılacak dizi analizleri için kullanılacak olan primerler “Primer 3 programı” kullanılarak belirlendi. Bu program ile SRY geni için 2 primer, CBX2 geni için ise 8 primer dizayn edildi. (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Daha sonra primerlerin özgüllüğü, blast programı kullanılarak kontrol edildi (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHoe)

Bu primerler ve PZR ile amplifiye olan DNA ürünlerinin uzunlukları aşağıda sıralanmıştır;

SRY geni primerleri

Primer 1

Forward (F); 5'- TTTCGAACTCTGGCACCTTT-3'

Reverse (R); 5 -'TCTTGAGTGTGTGGCTTTTCG-3'

PZR ürünü=576 baz çifti (bç)

Primer 2

F; 5'-AAGGCAACGTCCAGGATAGA-3'

R; 5'-GGCCTTTATTAGCCAGAGAAAA-3'

PZR ürünü= 580 bç

CBX2 geni primerleri

Primer 1a

F; 5'-CGAAGTCCCTAGGCACCTCCT-3'

R; 5'-CTCACTTGGAGGACCAGCCG-3'

PZR ürünü: 560 bç

Primer 1b

F; 5'-AGTGCATCCTGAGCAAGCG-3'

R; 5'-GGCGTGTAACAAAGGGCAA-3'

PZR ürünü 346 bç

Primer 2

F; 5'-GAGTCCTCTTGTGGCCTTGTT-3'

R; 5'-TAAGGGACCTCAGACCACAGC-3'

PZR ürünü: 443 bç

Primer 3

F; 5'-GGAAGCCATAGAGTCCCACAT-3'

R; 5'-AGTAGCCCCCAAATCTTAGGC-3'

PZR ürünü: 587 bç

Primer 4

F; 5'-TGCTGCAGACAAGCACTCTTC-3'

R; 5'-CAGCAGGGAATCCTGTTCATT-3'

PZR ürünü: 546 bç

Primer 5

F; 5'-AACAGGCAGTGGAGGTGTGA-3'

R; 5'-CTCACGGGTCTTCGGGTTG- 3'

PZR ürünü: 611 bç

Primer 6

F;5'-CAAACCCGAGCTGAAGGATC-3'

R; 5'-TGCCATTCTTGACACTCTGCA-3'

PZR ürünü: 638 bç

Primer 7

F;5'-TGGAGCAGAAAGTGGGGAACA-3'

R;5'-ACACCATAGGCAGGGAAGGG-3'

PZR ürünü: 703bç

Her bir hasta DNA'sı için 10 adet 0,2 ml'lik PZR tüpü numaralanarak hazırlandı. Bu tüplerin her birine toplam hacim 25 µl olacak şekilde

- 15,4 µl steril bidistile su
- 2,5 µl 10XPCR buffer (magnezyumsuz) (Fermantas®)
- 2 µl MgSO₄(Fermantas®)
- 0,5 µl dNTP miks (Fermantas®)
- 3 µl DNA çözeltisi
- 0,5 µl forward primer (Genoks®)
- 0,5 µl reverse primer (Genoks®)
- 0,3 µl Taq DNA polimeraz (Fermantas®) eklendi.

Tüpler ısı döngüleyicide aşağıdaki programlara göre tutuldu (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Isı döngüleyicide uygulanan amplifikasyon programı

Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
95 °C	10 dakika	1
95 °C	30 saniye	35
60 °C	30 saniye	
72 °C	30 saniye	
72 °C	5 dakika	1
4 °C	Bekleme	

PZR işlemi sonlandıktan sonra, her bir tüpten 3 µl PZR ürünü alındı, 1 µl DNA boyası (10X gel loading) ile karıştırıldı. Boyanan PZR ürünü ve 50 bç DNA (Promega®) marker ile agaroz jelde yürütülmek üzere hazırlandı.

3.4.2. PZR Örneklerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

Agaroz jel elektroforezi, amplifiye edilmiş DNA molekülünün tanımlanması, ayrıştırılması ve saflaştırılması için kullanılır. Agaroz jelde, DNA molekülleri içerdikleri nükleotid sayısının logaritması ile ters orantılı olarak anoda doğru göç ederler. Bu göç hızı jele eş zamanlı applike edilen kontrol DNA marker ile değerlendirilir.

Kullanılan malzemeler ve cihazlar;

- Agaroz (Sigma®)
- 1XTBE (Tris-borik asit-EDTA) buffer (Sigma®)
- Yükleme boyası (Loading jel)(50 bç marker (Promega®))
- Ethidyum bromür (EtBr) (Zeydanlı®)
- Mikrodalga fırın (Arçelik®)
- Yatay elektroforez tankı (Apollo®)
- Elektroforez güç kaynağı (Labnet® Power station 300)
- Jel görüntüleme cihazı (Syngene®)
- Spektrofotometre (ND 1000, USA)

Agaroz jelin hazırlanması ve örneklerin yürütülmesi;

2 g agaroz tartıldı ve erlene koyuldu, üzerine 100 ml 1XTBE buffer eklenerek mikrodalga fırında 300 °C’da 3 dk kaynatıldı. Kaynamış olan jel biraz soğutulduktan sonra üzerine 10 µl EtBr eklenerek iyice karıştırıldı. Daha önceden hazırlanmış jel kabarcık oluşturmayacak şekilde traye döküldü ve tarakları yerleştirildi. Polimerizasyon için yaklaşık 15-20 dk beklendikten sonra jel örneği 3 µl yükleme boyası ve 1 µl DNA örneği olacak şekilde karıştırılarak jele yüklendi. Örnekler 120 voltta 20 dk yürütüldü. Daha sonra jel görüntüleme cihazında görüntülenerek PZR’nin başarısı değerlendirildi ve temiz bant oluşturan PZR örneklerine dizi analizi yapıldı.

3.4.3. DNA Dizi Analizi

Elde edilen PZR ürünleri “SeqFinder Sequencing System Kit” kullanılarak kit protokolüne göre, “Applied Biosystems 310 Genetic analyzer with Data Collection Software v2.0” için hazırlandı.

Kullanılan malzemeler;

- ExoSAP-IT (GML®)
- MicroAmp® Clear Adhesive Film (Applied Biosystems®)
- Big Dye® terminator mix (Applied Biosystems®)
- Sequencing Buffer (Applied Biosystems®)
- Sequence Primer Forward/ Reverse (Alpha®)
- Plate çevirici

- Sephadex (Sigma®)
- Distile su

PZR ürünün temizlenmesi;

PZR ürünlerini içeren tüpler, PZR plate içinde 100 g'de 1 dk santrifüj edildi. 5 µl'lık PZR ürününe 2 µl olacak şekilde her tüpün içine "ExoSAP-IT" eklendi. Plate'in üzeri MicroAmp® Clear Adhesive Film ile kaplandı ve tüm içeriğin karışması için yapılan vorteksleme işlemi sonrasında 1000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Reaksiyon hacmi 7 µl olarak (5 µl'lık PZR ürünü ve 2 µl ExoSAP-IT) ısı döngüleyicide Tablo 3.4'de verilen programa göre amplifiye edildi.

Tablo 3.4. Isı döngüleyicide uygulanan amplifikasyon programı

Sıcaklık	Süre
37 °C	30 dakika
80°C	15 dakika
4 °C	Bekleme

Dizi analizi reaksiyonlarının hazırlanması;

Tüm reaksiyonlar için, Forward ve Reverse primerleri içeren 2 ayrı dizileme reaksiyon karışımı hazırlandı. 2 µl BigDye® Terminator miks, 2 µl sequencing buffer, 2 µl sequence F/R primer ve 2 µl distile su ile hazırlanan total hacmi 8 µl olan karışımlar, reaksiyon plateine mikropipet yardımıyla konuldu. Bu

karışımların üzerine 2 µl PZR ürünü eklenerek vortekslendi. Sonrasında 1000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi.

Dizi reaksiyonları; Reaksiyon hacmi 10 µl olan karışımlar Tablo 3.5’te verilen programda amplifiye edildi.

Ürünlerin pürifikasyonu;

İçine 700 µl Sephadex karışımı (1 gram Sephadex+ 14 ml distile su) konulan 2 ml’lik tüp 2400 g’de 2 dk santrifüj edildi.

Tablo 3.5. Isı döngüleyicide uygulanan amplifikasyon programı

Sıcaklık	Süre
96 °C	1 dakika
96°C	10 dakika
50 °C	5 saniye
60°C	4 dakika
4 °C	Bekleme

Elektroforez, Applied Biosystems 310 Genetic Analyzer with Data Collection Software v2.0’ye göre aşağıdaki gibi yapıldı.

- Polymer POP-6 TM
- Running buffer Applied Biosystems Genetic Analyzer Running Buffer
- Capillary Array 47 cm
- Module Seq POP6 Rapid (1ml).E.md4
- Dye Set/Primer KB_310_POP6_BDTv3.36Rapid.mob
- Basecaller KB.bcp

DNA dizileme sonrası analizler, SeqScape programında yapıldı.

Bütçenin yetersiz olması nedeni ile *WT1* geni dizi analizleri Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi Moleküler Genetik Laboratuvarı tarafından yapılmıştır.

3.5. Cytogenetics Whole-Genome 2.7M Array Çalışması (Affymetrix®)

- Array çalışması sistem sağlayıcı firmanın protokolüne uyularak Şekil 3.1’de özetlendiği gibi yapıldı (45).
- Array çalışmasında kullanılacak olan DNA’ların konsantrasyonları spektrofotometrede yaklaşık olarak 250 ng/μl yoğunluğunda ölçülmüştü. Tüm DNA’ların optik dansite (OD 260/280) oranının 1.8 ile 2 arasında bulunmasına dikkat edildi.
- Elde edilen DNA’lar degrade olmadığından emin olmak için %1’lik agaroz jelde yürütüldü.
- Moleküler karyotiplemede 33 ng/μl DNA kullanılacağı için, hastaların kanından elde edilen, yaklaşık olarak 250 ng/μl yoğunluğundaki DNA’lar, 1xTE buffer ile dilüe edildi.

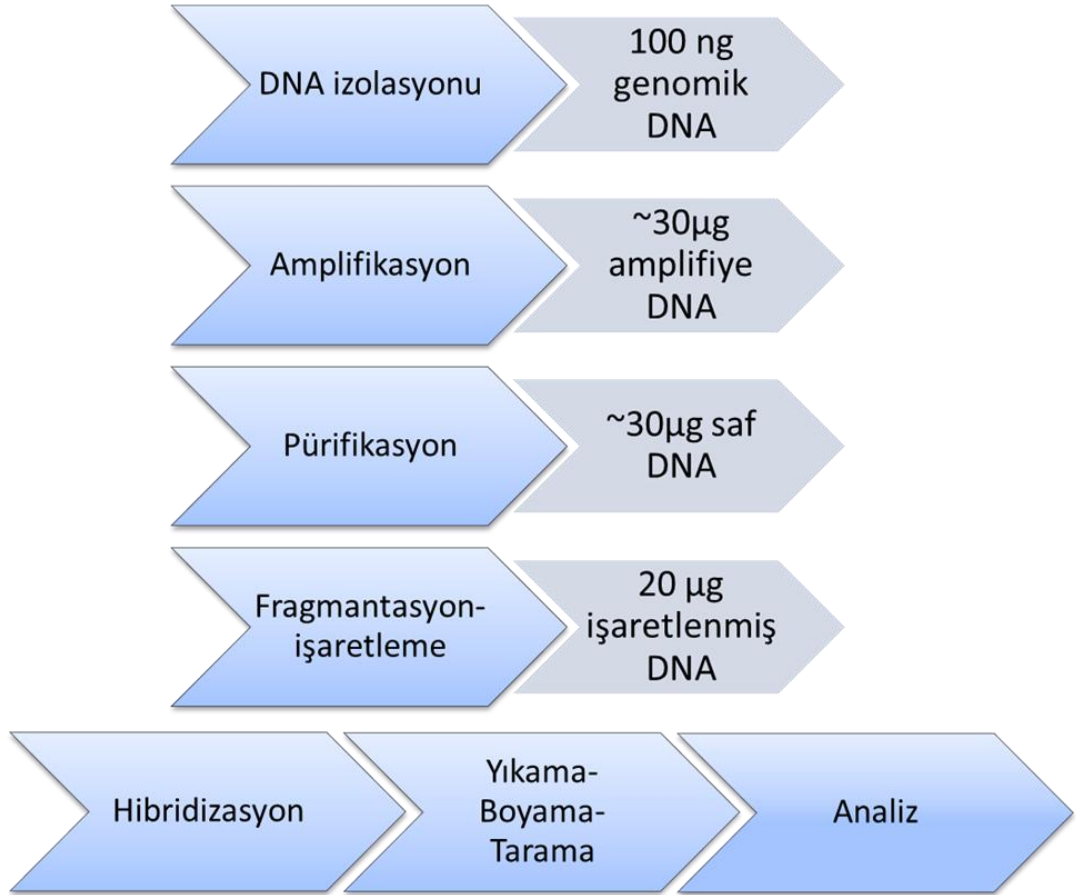
3.3.1. Tüm Genom Amplifikasyonu

Bu basamak ve sonraki basamaklarda kullanılacak olan tüm malzemeler sağlayıcı firma tarafından (Affymetrix® USA) tedarik edilmiştir.

Gerekli malzemeler:

- Cyto 10x Denaturasyon Solüsyonu (DS) (-20 °C)

- Cyto 10x Nötralizasyon Solüsyonu (NS) (-20 °C)
- Cyto Amplifikasyon reaksiyonu Bufferı (-20 °C)
- Cyto Amplifikasyon enzimi (-20 °C)
- Cyto Water (oda sıcaklığı)
- 1,5 ml'lik ependorf



Şekil 3.1. Array 2.7 çalışmasının basamakları

Yöntem:

- DS, NS ve Amplifikasyon bufferı -20 °C'den çıkarılarak oda sıcaklığında çözünmesi beklendi. Amplifikasyon tamponu çözündükten sonra kuvvetlice vortekslenip, maksimum hızda spin yapılmış ve buz üzerinde bekletildi. DS ve NS ise oda sıcaklığında bekletildi.
- 10x DS ve 10x NS, 1x haline dilüe edildi, vorteks ve spin yapıldı.
- 1,5 ml'lik tüplere 33 ng/ μ l'ye dilue edilen genomik DNA'dan 3'er μ l konuldu ($3 \times 33 = 99$, yaklaşık 100 ng).
- Üzerine oda sıcaklığında 1x DS 3 μ l eklendi ve vorteks-spin yapıldı.
- 3 dk oda sıcaklığında beklendikten sonra örnekler üzerine 1x NS'den 6'şar μ l eklenip, vorteks spin yapılarak toplam volümü 12 μ l olan örnekler buza konuldu.
- Hiç beklenilmeden, buzda bulunan amplifikasyon bufferdan 50 μ l ve -20 °C'deki amplifikasyon enziminden 2,5 μ l eklenerek elde edilen toplam 64,5 μ l'lik her bir örnek vortekslenerek spin yapıldı.
- Hazırlanan örnekler amplifikasyon için önceden 30°C'ye ısıtılmış ısı döngüleyiciye yerleştirildi ve Tablo 3.6'de verilen program uygulandı.

Tablo 3. 6. Isı döngüleyicide uygulanan amplifikasyon programı

Cyto Amplifikasyon Programı	
Sıcaklık	Süre
30 °C	16 saat
65 °C	3 dakika
4 °C	Bekleme

Yöntem:

- Kit ilk açıldığında Cyto pürifikasyon yıkama bufferına %100'lük etanolden 10,5 ml eklendi.
- +4 °C'den çıkarılan Cyto Magnetik Bead homojen olacak şekilde vortekslendi.
- 64,5 µl'lik amplifiye olmuş örnekler, altı düz olan 2ml'lik ependorflara alındı ve üzerlerine 90 µl Magnetik Bead eklendi.
- 10 kez pipetaj yapıp, 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra ependorflar manyetik alan üzerine alınarak sıvı tam şeffaf olana kadar bekletildi (yaklaşık 5 dk).
- Manyetik Bead'lere bağlanarak ependorfun manyetik alan yönünde bulunan yüzeyine yapışan DNA'ya dokunulmadan şeffaf süpernatantlar pipet ile çekildi.
- Manyetik alandan çıkarılan ependorf üzerine, daha önceden %100'lük etanol eklenmiş haldeki Cyto pürifikasyon yıkama buffer'ından 200 µl eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildikten sonra yine manyetik

alanda sıvı şeffaflaşana kadar (yaklaşık 1 dk) bekletildi ve şeffaf süpernatant atıldı. Bu yıkama işlemi aynı şekilde 2 kez tekrarlandı.

- Ependorf içindeki çökeltinin kurumasına müdahale edilmeden 50 µl Cyto elution buffer ilave edildi ve 15-30 dk sıvı homojen olana kadar en yüksek hızda vortekslendi.
- 1500 rpm'de 1 dk spin yapıldıktan sonra, manyetik alan üzerinde; 15 dk ependorfun kapağı kapalı, 15 dk açık olacak şekilde bekletildi ve şeffaf süpernatantlar (yaklaşık 45 µl) yeni ependorflara alındı.
- Vorteks-spin yapıldıktan sonra spektrofotometrede ölçülmek üzere örnekler 1/10 oranında sulandırıldı. Ölçümde yoğunluğun 1-2 µg/ml, OD260/OD280 oranının ise 1.8 - 2 arasında olmasına dikkat edildi.

3.3.3. Fragmantasyon- İşaretleme

Bu aşamada amplifiye edilmiş ve saflaştırılmış gDNA, parçalara ayrılarak işaretleme yapıldı.

Gerekli Malzemeler:

- Cyto Frag-Label Buffer (-20 °C)
- Cyto Frag-Label Enzimi (-20 °C)

Yöntem:

- Oda sıcaklığında çözündürülen Cyto Frag-Label Buffer, vorteks-spin yapıldıktan sonra, Cyto Frag-Label enzimi ise direkt olarak buz üzerine yerleştirildi.

- Buz üzerinde yeni ependorflara pürifiye edilmiş örneklerden 37'şer µl konulduktan sonra, üzerlerine 10 µl Frag-Label Bufferı ve 3 µl Frag-Label enzimi eklenen (toplam volümü 50 µl) örnekler vorteks-spin yapıldıktan sonra Tablo 3.7'de verilen programa göre ısı döngüleyiciye yerleştirildi.

Tablo 3.7. Isı döngüleyicide uygulanan fragmentasyon ve işaretleme programı

Cyto Frag-Label Programı	
Sıcaklık	Süre
37 °C	2 saat
95 °C	10 dakika
4 °C	Bekleme

- Reaksiyon sonrasında örnek, fragmentasyonun kontrolü için %4'lük agaroz jelde yürütüldü. 2,5 µl örnek, 2,5 µl orange dye ile boyanarak marker eşliğinde jele yüklendi, 140 voltta 20 dk yürütülmüştür. Bant yoğunluğu 50-200 bç arasında görülerek fragmentasyon kontrolü yapıldı.

3.3.4. Hibridizasyon

Bu aşamada array çiplerini sağlayan firmaya ait hibridizasyon fırını kullanıldı. Hibridizasyon buz üzerinde yapıldı.

Gerekli malzemeler:

- Cyto Hibridizasyon Buffer (-20 °C)
- Array 2.7 çipi
- Hibridizasyon fırını (Affymetrix® Hybridization Oven 640)

Yöntem:

- Hibridizasyon bufferı, kullanılmadan önce 15 dk buzda bekletildi. Sonrasında buz üzerindeki her bir örnek üzerine, 100 µl hibridizasyon bufferı eklenerek elde edilen 147,5 µl hacimli örnekler, vorteks ve spin yapıldıktan sonra denature edilmek üzere aşağıda verilen programa ayarlanmış ısı döngüleyiciye yüklendi (Tablo 3.8).
- Denatüre olan örnekten 130’ar µl pipete çekilerek array çipinin bölmelerine yavaşça yüklenmiştir. Yuvarlak etiketlerle bölmeler kapatılarak 50 °C’ye ısıtılmış hibridizasyon fırınında 60 rpm’de çevrilecek şekilde 16 ila 19 saat arasında inkübe edildi.

Tablo 3.8. Isı döngüleyicide uygulanan denatürasyon programı

Cyto Denatürasyon Programı	
Sıcaklık	Süre
95 °C	5 dakika
50 °C	15 dakika
50 °C	Bekleme

3.3.5. Yıkama, Boyama ve Arrayların Taranması

Bu aşamada arrayler yıkanıp boyanarak analiz edilmek üzere tarama işlemleri gerçekleştirildi.

Çalışmanın bu basmağında da yıkama, boyama ve tarama işlemlerinde sağlayıcı firmaya ait cihazlar kullanıldı.

Gerekli malzemeler:

- Sıvı İstasyonu 450 (Affymetrix Genechip® Fluidics Station 450)
- Tarayıcı (Affymetrix Genechip® Scanner 3000)
- 1,5 ml ependorf (doğal, mavi ve kırmızı)
- Sitogenetik Reagent kiti:
 - Cyto Boyama Buffer 1 (4 °C - amber)
 - Cyto Boyama Buffer 2 (4 °C - amber)
 - Cyto Holding Buffer (4 °C - amber)
 - Cyto Yıkama Buffer A (oda sıcaklığı- turuncu)
 - Cyto Yıkama Buffer B (oda sıcaklığı- turuncu)

Yöntem:

- Yıkama İstasyonunda (Fluidics station) bulunan boş şişelere 500'er ml Cyto Yıkama Buffer A ve B eklendi. Su şişesi doldurulup, çöp şişesi boşaltıldıktan sonra sistem ön yıkama yapması için PRIME-450 programı ile çalıştırıldı.

- Bu sırada 4 °C’de bulunan Cyto Boyama buffer 1 ve 2 ile Holding Buffer oda sıcaklığında bekletildi ve Tablo 3.9’de gösterildiği gibi 1,5ml’lik tüplere alındı.
- 1,5 ml’lik renkli tüplerde bulunan Cyto Boyama buffer 1 ve 2 ile Holding Buffer yıkama istasyonuna yerleştirilmiştir. “*Cytogenetics Focused Array 450*” protokolü seçilerek cihaz çalıştırılmıştır. Sonra kartuş kartları array çiplerini yerleştirmek üzere açılmıştır.

Tablo 3.9. Yıkama ve Holding Bufferların Tüplere Bölünmesi

Reagent	Tüpün rengi	Tüplere konulan volüm
Cyto Boyama Buffer 1	Amber	500 µl
Cyto Boyama Buffer 2	Mavi	500 µl
Cyto Holding Buffer	Natural	800 µl

- Hibridizasyon fırınından alınan array çipleri (tek seferde 4 adet olmak üzere) üzerindeki yuvarlak kapama etiketleri kaldırıldıktan sonra yıkama istasyonuna yerleştirilmiş ve barkotları okutularak sistem yıkama ve boyama yapması için çalıştırılmıştır.
- Program sonlandığında array çipleri çıkarılarak bölmelerin üzerine tekrar kapama etiketi yapıştırılmıştır. Tarama yapılacak bilgisayara tekrar barkodları okutturulan array çipleri tarayıcıya yüklenerek sistem çalıştırılarak tarama işlemi yapılmıştır.

3.3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışmanın sonuçları “Chromosome Analysis Suite (ChAS) v1.2.1 Software (Affymetrix®)” programı ile analiz edilmiştir. Olgulara ait veriler “CEL” dosyalarına dönüştürülmüş ve analiz edilmek üzere taramaların gerçekleştirildiği sistemin yüklü olduğu bilgisayardan analizlerin yapılacağı Anabilim dalımızdaki bir bilgisayara taşınmıştır. Analizlerin yapıldığı bilgisayara;

- Affymetrix® Chromosome Analysis Suite (ChAS) v1.2.1 Software,
- Cytogenetics Array NetAffix® Analysis fileset version NA32 (hg19) programları firma tarafından yüklenmiştir.

Bu program yüksek çözünürlükte bir “CytoScan Array” ile kullanıldığında, submikroskopik kromozomal yeniden düzenlenimlerin tespitine ve analizine imkan vermektedir. Kromozomal anomaliler açısından araştırılan hastaların verilerinin yorumlanmasına, bulunan değişikliklerin karyogram üzerinde ve bazı grafiklerde gösterilmesine, değişikliğin bulunduğu bölgedeki genlerin ve bu genlerin veri tabanlarında araştırılmasını sağlayan bağlantılar içerdiğinden özelleşmiş sitogenetik araştırmalara olanak sağlamaktadır (45).

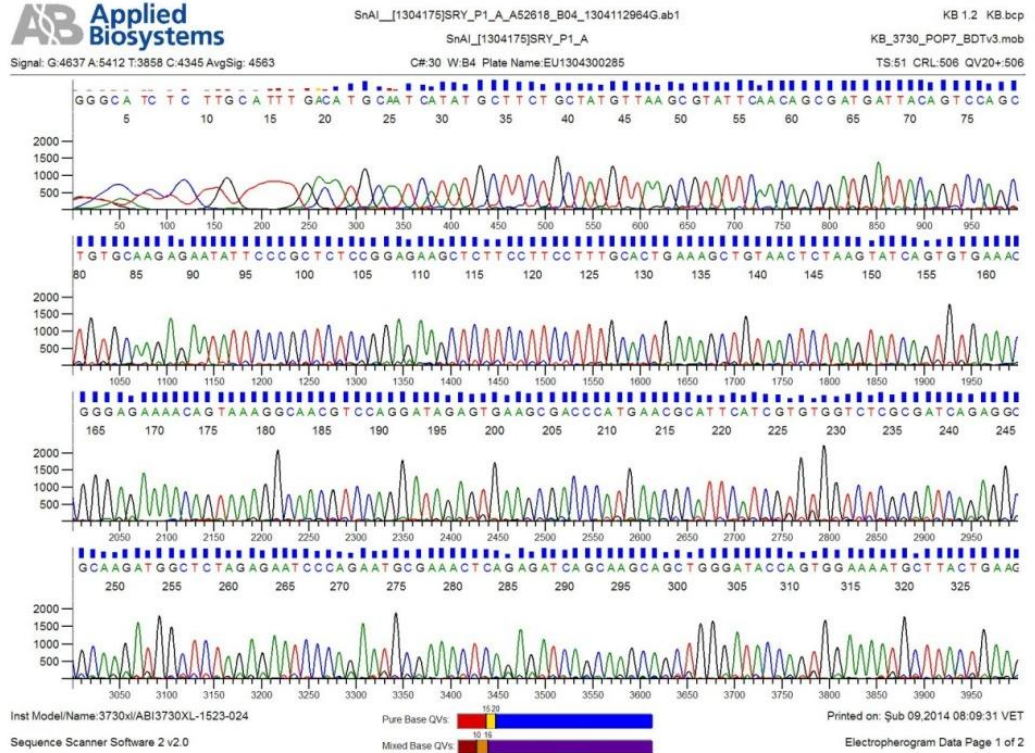
Çalışmada araştırılan olgularda tespit edilen kayıp ve kazançlar (Gain/loss) için 200 kb’lik sınır belirlenmiştir.

Sonuçlarda bulunan değişiklikler; DECIPHERv4.1 (Database of Chromosome Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources), Ensembl, HGMD (The Human Gene Mutation Database), DGV (Database of Genomic Variants), Genecards gibi internet üzerinden ulaşılabilen veritabanları

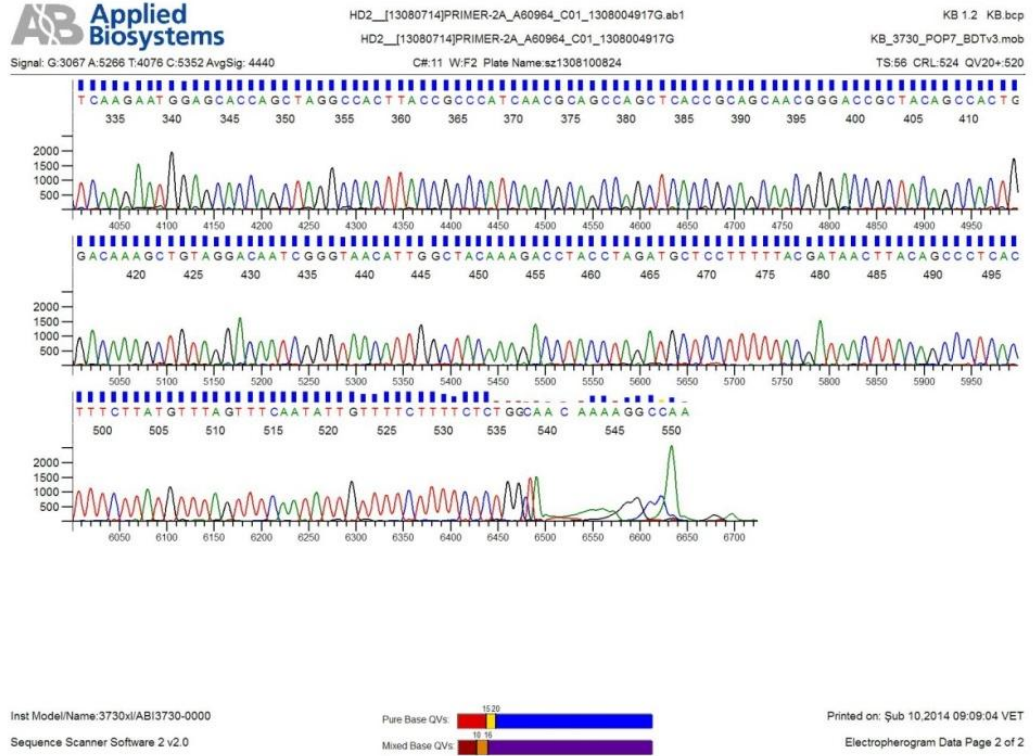
ile OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) ve PubMed (the U.S. National Library of Medicine) gibi online kütüphaneler kullanılarak değerlendirilmiştir (13, 46-50).

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 46,XY karyotip yapısına sahip dişi fenotipte ve *SRY* geninde konvansiyonel PZR yöntemi ile delesyon saptanmayan 10 olguya, öncelikle *SRY* geninde mutasyon olup olmadığı araştırılmak üzere, *SRY* genine dizi analizi yapıldı. Veriler “Sequence Scanner Software 2” programı ile analiz edildi. Referans dizi ile karşılaştırılarak yapılan analizler sonucunda, hastaların hiçbirinde *SRY* geninde mutasyon tespit edilmedi. Olgu 1 ve 2’ye ait *SRY* dizi analizi örneği sırasıyla Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Olgu 1’e ait *SRY* geni dizi analizi örneği



Şekil 4.2. Olgu 2'ye ait SRY geni dizi analizi örneği

SRY geninde mutasyon saptanmayan 10 hastanın *WT1* geni dizi analizi projedeki maddi kaynak sıkıntısı nedeni ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi Moleküler Laboratuvarında yapılmıştır. Hastaların hiçbirinde söz konusu gende mutasyon saptanmazken, *WT1* geninin 1, 3, 7 ve 10. ekzonlarında daha önce polimorfizm olarak bildirilen tek nükleotid değişiklikleri (Single nucleotide polymorphism=SNP) izlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Olguların *WT1* geni dizi analizi sonuçları, bulunan SNP'ler ve rs numaraları

Ekzon Olgu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	N	N	-c.872+16G>A heterozigot rs1799933 -c.872+82G>T heterozigot rs5030170 -c.872+85G>C heterozigot rs5030171	N	N	N	N		N	N
2	N	N	-c.872+82G>T homozigot rs5030170 -c.872+85G>C homozigot rs5030171	N	N	N	CGA-CGG R369R homozigot	N	N	N
3	CCC-CCT P110P heterozigot rs1799925	N	-c.872+82G>T heterozigot rs5030170 -c.872+85G>G heterozigot rs5030171	N	N	N	CGA-CGG R369R heterozigot rs16754	N	N	3'UTR+267G>C heterozigot rs5030317
4	N	N	-c.872+16G>A heterozigot rs1799933	N	N	N	N	N	N	-3'UTR+88A>G heterozigot rs5030315 -3'UTR+224A>G heterozigot rs5030316 -3'UTR+267G>C heterozigot rs5030317
5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	CCC-CCT P110P heterozigot rs1799925	N	-c.870+82G>T heterozigot rs5030170 -c.870+85G>C heterozigot rs5030171	N	N	N	CGA-CGG R369R heterozigot rs16754	N	N	3'UTR+267G>C heterozigot rs5030317
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8	CCC-CCT P110P heterozigot rs1799925	N	c.870+82G>T heterozigot rs5030170 -c.870+85G>C heterozigot rs5030171	N	N	N	N	N	N	-3'UTR+88A>G heterozigot rs5030315 -3'UTR+224A>G heterozigot rs5030316 -3'UTR+267G>C heterozigot rs5030317
9	CCC-CCT P110P heterozigot rs1799925	N	-c.870+16G>A heterozigot rs1799933 -c.870+82G>T heterozigot rs5030170 -c.870+85G>C heterozigot rs5030171	N	N	N	CGA-CGG R369R heterozigot rs16754	N	N	-3'UTR+88A>G heterozigot rs5030315 -3'UTR+224A>G heterozigot rs5030316 -3'UTR+267G>C heterozigot rs5030317
10	CCC-CCT P110P heterozigot rs1799925	N	-c.870+82G>T heterozigot rs5030170 -c.870+85G>C heterozigot rs5030171	N	N	N	CGA-CGG R369R heterozigot rs16754	N	N	3'UTR+267G>C heterozigot rs5030317

Tablo 4.2. WT1 geni analiz sonuçları ve SNP allel frekansları

OLGU	Ekzon	SNP	Minör Allel frekansı (MAF) %
1	3	-c.870+16G>A heterozigot	21
		-c.870+82G>T heterozigot	35
		-c.870+85G>C heterozigot	35
2	3	-c.870+82G>T homozigot	35
		-c.870+85G>T homozigot	35
	5	c.A1107G (CGA-CGG R369R) homozigot	32
3	1	c.C330T (CCC-CCT P110P) heterozigot	31
	3	-c.870+82G>T heterozigot	35
		-c.870+85G>C heterozigot	35
	7	c.A1107G (CGA-CGG R369R) heterozigot	32
4	10	3'UTR+267 G>C heterozigot	45
	3	-c.870+16G>A heterozigot	21
		-3'UTR+88 A>G heterozigot	12
		-3'UTR+224 A>G heterozigot	11
6	3	-3'UTR+267 G>C heterozigot	45
		CCC-CCT P110P heterozigot	31
		-c.870+82G>T heterozigot	35
	7	-c.870+85G>C heterozigot	35
8	10	CGA-CGG R369R heterozigot	32
	1	3'UTR+267 G>C heterozigot	45
		CCC-CCT P110P heterozigot	31
		-c.870+82G>T heterozigot	35
9	3	-c.870+85G>C heterozigot	35
		-3'UTR+88 A>G heterozigot	12
		-3'UTR+224 A>G heterozigot	11
	10	-3'UTR+267 G>C heterozigot	45
10	1	CCC-CCT P110P heterozigot	31
		-c.870+16G>A heterozigot	21
		-c.870+82G>T heterozigot	35
	3	-c.870+85G>C heterozigot	35
10	7	CGA-CGG R369R heterozigot	32
		-3'UTR+88 A>G heterozigot	12
		-3'UTR+224 A>G heterozigot	11
	10	-3'UTR+267 G>C heterozigot	45

Cinsiyet gelişim anomalilerinden sorumlu olduğu bilinen; 9p, 10q delesyonları, Xp21-22 (*DAX1* genini de içeren bölge) duplikasyonu ile daha önce bildirilmeyen ve seks reversala neden olabilecek diğer mikroduplikasyon/mikrodelesyonların tespit edilmesi için tüm hastalara array (2.7) analizi yapıldı. Hastalara ait array analiz sonuçları Tablo 4.3- Tablo 4.12’de gösterilmiştir. Array çalışma sonuçlarında tespit edilen tüm veriler NCBI, DECIPHER ve DGV veritabanlarından faydalanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, hastaların klinik bulgularını açıklayacak ve literatürde cinsiyet gelişim anomalilerinde daha önce bildirilmiş olan 9. kromozomun p kolunun ve 10. kromozomun q kolunun terminal bölge delesyonları ya da X kromozomunun p21-p22 bölgesinin duplikasyonu saptanmazken çeşitli mikrodelesyon ve mikroduplikasyonlar saptanmıştır. Bunlardan 8q24.3 bölgesindeki kazanç bölgesi, Olgu 1 ve 4’de ortak kazanç bölgesi olması ve bu bölgenin duplikasyonunun yapılan bir çalışmada gonadal disgenezili bir olguda da bulunması nedeni ile dikkate değer bulunmuştur (63).

Tablo 4.3. Olgu 1’e ait array analizi sonuçları

Kromozom	Tip	Başlangıç Bitiş	Kb	Genler
8q24.3	Kazanç	144,238,010 145,751,248	1513,2	<i>LY6H, GPIHBP1, ZFP41, GLI4, ZNF696, TOP1MT, C8ORF51, RHPN1, MAFA, ZC3H3, GSDMD, C8ORF73, NAPRT1, EEF1D, TIGD5, PYCRL, TSTA3, ZNF623, ZNF707, BREA2, LOC100130274, MAPK15, FAM83H, LOC100128338, SCRIB, MIR937, PUF60, NRBP2, EPPK1, PLEC, MIR661, PARP10, GRINA, SPATC1, OPLAH, EXOSC4, GPAA1, CYC1, SHARPIN, MAF1, KIAA1875, C8ORF30A, HEATR7A, SCXB, SCXA, BOP1, HSF1, DGAT1, SCRT1, C8ORFK29, FBXL6, GPR172A, ADCK5, CPSF1, MIR939, MIR1234, SLC39A4, VPS28, NFKBIL2, CYHR1, KIFC2, FOXH1, PPP1R16A, GPT, MFSD3, RECQL4, LRRC14, LRRC24</i>

Tablo 4.4. Olgu 2’ye ait array analizi sonuçları

Kromozom	Tip	Başlangıç- Bitiş	Kb	Genler
1q21.2	Kayıp	147,065,130- 147,353,398	288,2	<i>LOC388692</i>
2q37.1	Kazanç	233,178,980- 233,412,564	233,6	<i>DIS3L2,ALPP, ECEL1P2, ALPL2,ALPI, ECEL1, LOC646960, CHRND, CHRNG</i>
7q11.23	Kayıp	74,145,357- 74391436	246	<i>GTF2I,NCF1,GTF2IRD2, STAG3L2,PMS2P5,GATSL1</i>
17p11.2	Kazanç	17,439,501- 17,656,768	217	<i>PEMT, RAI1</i>

Tablo 4.5. Olgu 3’e ait array analizi sonuçları

Kromozom	Tip	Başlangıç Bitiş	Kb	Genler
16p11.2	Kazanç	34,490,200- 34,744,260	254,06	<i>LOC283914, LOC146481, LOC100130700</i>
10q26.3	Kazanç	135,218,338- 135,428,108	209,7	<i>MTG1, SPRN, LOC619207, CYP2E1, SYCE1</i>
Xp22.33	Kayıp	1,211,483- 1,415,914	204,431	<i>CRLF2, CSF2RA</i>

Tablo 4.6. Olgu 4'e ait array analizi sonuçları

Kromozom	Tip	Başlangıç- Bitiş	Kb	Genler
3q27.3	Kazanç	186,568,501- 186,782,534	214	<i>ADIPOQ, ST6GAL1</i>
8p11.1	Kazanç	16,629,141- 16,853,072	295	<i>POTEA</i>
8q24.3	Kazanç	144,308,962- 145,817,594	1508	<i>ZFP41, GLI4, ZNF696, TOP1MT, C8ORF51, RHPN1, MAFA, ZC3H3, GSDMD, C8ORF73, NAPRT1, EEF1D, TIGD5, PYCRL, TSTA3, ZNF623, ZNF707, BREA2, LOC100130274, MAPK15, FAM83H, LOC100128338, SCRIB, MIR937, PUF60, NRBP2, EPPK1, PLEC, MIR661, PARP10, GRINA, SPATC1, OPLAH, EXOSC4, GPAA1, CYC1, SHARPIN, MAF1, KIAA1875, C8ORF30A, HEATR7A, SCXB, SCXA, BOP1, HSF1, DGAT1, SCRT1, C8ORFK29, FBXL6, GPR172A, ADCK5, CPSF1, MIR939, MIR1234, SLC39A4, VPS28, NFKBIL2, CYHR1, KIFC2, FOXH1, PPP1R16A, GPT, MFSD3, RECQL4, LRRC14, LRRC24, MGC70857, ARHGAP39</i>
11p15.4	Kazanç	16,629,141- 16,853,072	901	<i>INS-IGF2, IGF2, MIR483, IGF2AS, INS, TH, ASCL2, C11ORF21, TSPAN32, CD81, TSSC4, TRPM5, KCNQ1, KCNQ1OT1, KCNQ1DN, CDKN1C, SLC22A18AS, SLC22A18, PHLDA2, NAP1L4, SNORA54</i>

Tablo 4.7. Olgu 5'e ait array analizi sonuçları

Kromozom	Tip	Başlangıç- Bitiş	Kb	Genler
8p11.22	Kazanç	39,226,335- 39,388,919	202,584	<i>LOC643955, RNGTT</i>

Tablo 4.8. Olgu 6'ya ait array analiz sonuçları

Kromozom	Tip	Başlangıç	Bitiş	Kb	Genler
7q11.21	Kazanç	57,881,351	62,759,719	4878,368	LOC643955
6q15	Kazanç	89,449,946	89,737,643	287,697	RNGTT

Tablo 4.9. Olgu 7'ye ait array analizi sonuçları

Kromozom	Tip	Başlangıç	Bitiş	Kb	Genler
14q32.33	Kazanç	106,251,486	106,740,452	488,966	KIAA0125, ADAM6
16p11.2	Kazanç	34,448,198	34,795,780	347,582	LOC283914, LOC146481, LOC100130700

Tablo 4.10. Olgu 8'e ait array analizi sonuçları

Kromozom	Tip	Başlangıç	Bitiş	Kb	Genler
14q32.33	Kazanç	106,313,767	106,736,227	422,46	KIAA0125,ADAM6
11q14.1	Kazanç	78,361,133	78,778,557	417,424	ODZ4
4q21.1	Kazanç	78,090,456	78,432,861	342,405	CCNG2
Yq11.22	Kazanç	22,216,931	22,516,184	287,975	TTY16,TTY12

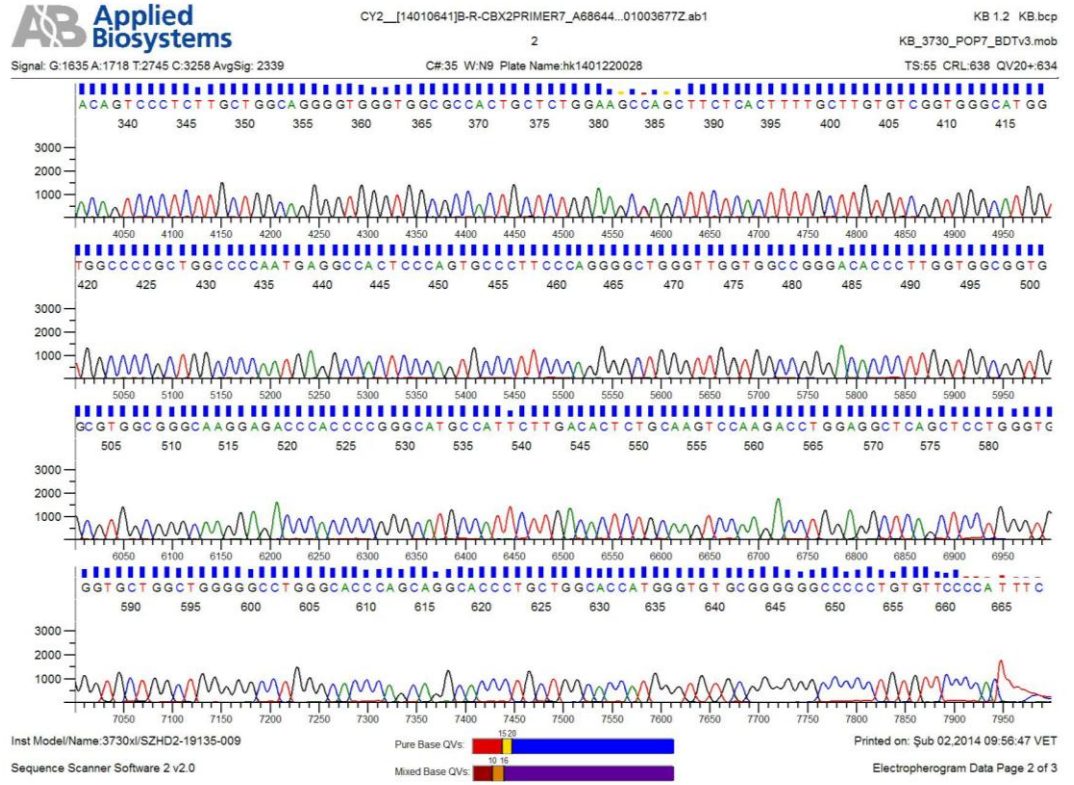
Tablo 4.11. Olgu 9'a ait array analizi sonuçları

Kromozom	Tip	Başlangıç	Bitiş	Kb	Genler
14q32.33	Kazanç	106,020,554	106,736,227	715,673	KIAA0125, ADAM6

Tablo 4.12. Olgu 10'a ait analiz sonuçları

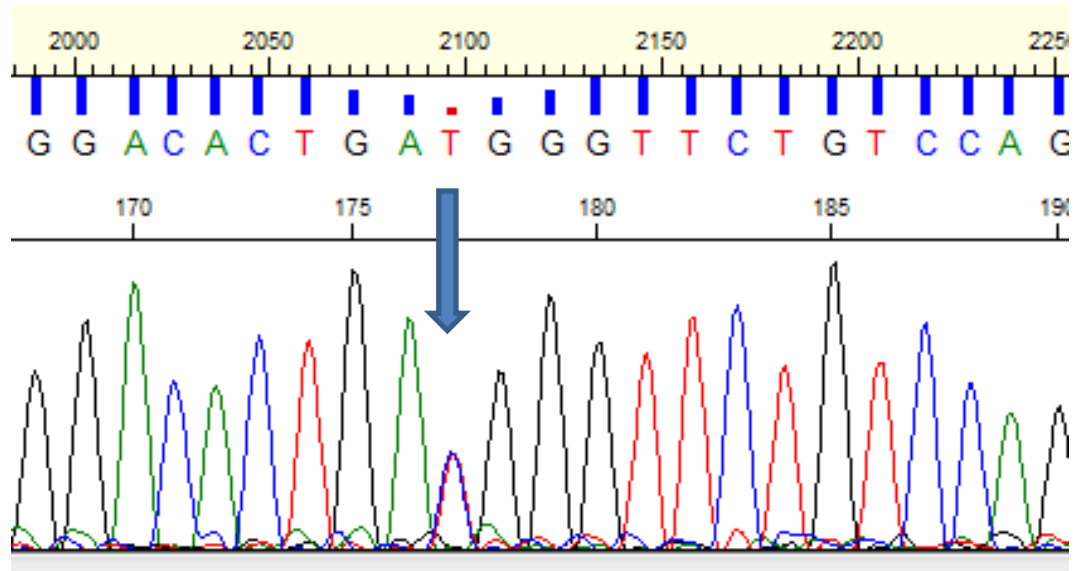
Kromozom	Tip	Başlangıç	Bitiş	Kb	Genler
10q26.3	Kazanç	135,252,931	135,426,389	206,78	LOC619207, CYP2E1, SYCE1, SPRNP1

Çalışmanın son basamağı olarak tüm hastalara *CBX2* geni dizi analizi yapılmıştır. Olgu 2'ye ait *CBX2* geni dizi analizi elektroferogram örneği Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

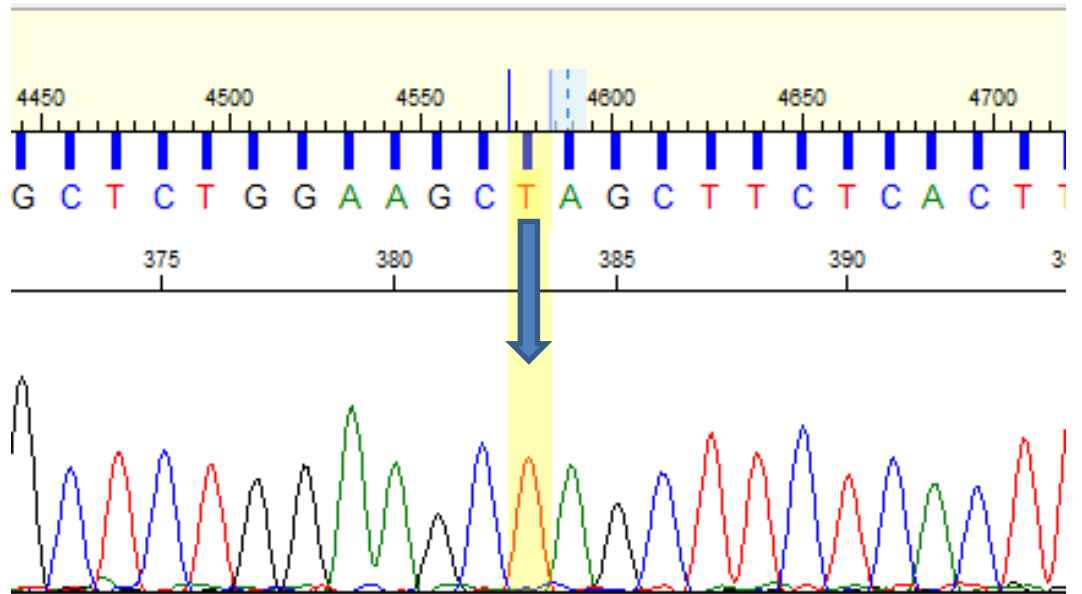


Şekil 4.3. Olgu 2'ye ait *CBX2* geninin (5. ekzon) dizi analizi örneği

Olgu 1, 3 ve 6'da herhangi bir değişiklik gözlenmezken, Olgu 2, 4, 7, 8, 9 ve 10'da *CBX2* geni 5. ekzonunda c.G1553A (rs3751957) MAF değeri 0,37 olan SNP tespit edilmiştir (Şekil 4.4.). Olgu 5'te 5. ekzonda MAF değeri 0,23 olan c.1242G>A (rs3751956) SNP tespit edilmiştir (Şekil.4.5).



Şekil 4.4. Olgu 4'e ait CBX2 geninin dizi analizi ve tek nükleotid değişikliği



Şekil 4.5. Olgu 5'e ait CBX2 geninin dizi analizi ve tek nükleotid değişikliği

5. TARTIŞMA

Cinsiyet gelişim bozuklukları, klinik olarak şüpheli genitalya ile seks reversal arasında değişen şiddette bulgularla ortaya çıkan ve moleküler temelleri tam olarak anlaşılamamış bir hastalık grubudur. Bu hastalarda etiyolojik nedenlere yönelik yapılan araştırmaların hastalara doğru tanı konulmasının yanı sıra, hastalığın moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve etiyolojik nedene yönelik tedavi yaklaşımlarının düzenlenmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Cinsiyet gelişim bozukluğu olan hastalar klinik olarak değerlendirildikten sonra, literatürde bildirilmiş olan nedenlerin ekarte edilmesi amacıyla cinsiyet gelişiminde ve farklılaşmasında etkili olduğu bilinen genler ile cinsiyet gelişim bozukluğuna neden olduğu bilinen kromozomal değişikliklerin araştırılması ilk yaklaşım olmaktadır. Bilinen etiyolojik faktörlerin normal olarak değerlendirilmesi durumunda, yeni etiyolojik nedenlere yönelik araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Bizim çalışmamızda, *SRY* geninde mutasyon tespit edilmeyen olgularımızda *WT1* ve *CBX2* geninin dizi analizi ve kromozomal delesyon ve duplikasyonların değerlendirilmesi için Array analizi yapılarak otozomal genetik faktörlerin hastalarımızdaki seks reversal fenotip üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Seks reversala neden olan *SOX9*, *ATRX*, *FOXL2*, *SF1* genleri, sendromik özelliklere ve ek anomalilere (mental retardasyon, adrenal yetmezlik vb.) neden neden oldukları için çalışmaya dahil edilmemiştir.

İlk kez 1955 yılında Swyer tarafından primer amenoresi, uzun boyu ve dişi dış genitalyası bulunan 46,XY karyotipine sahip 2 kadın hasta “46,XY seks reversal/ gerçek hermafroditizm” olarak tanımlanmıştır (44). 1959 yılında Y kromozomunun fare ve insanda erkek cinsiyet gelişimindeki önemi belirlenmekle birlikte, erkek cinsiyetin gelişiminden ve TDF (testis determining factor) salınımından sorumlu olduğu düşünülen gen bölgesinin araştırılma sürecine başlanmıştır (8). Bu bölge, SRY geni tanımlanıncaya kadar “TDF geni ” olarak isimlendirilmiştir.

46,XX karyotipli erkek fenotipli bir hastada, Y kromozomuna ait 230 kb’lık bir segmentin bulunması ve aynı bölgenin 46,XY dişi fenotipli bir hastada delete olması nedeniyle, Y kromozomuna ait bu bölgenin cinsiyet belirlenmesinde ana rol oynayan TDF geninin bir kısmını ya da tamamını içerdiği Page ve ark. tarafından öne sürülmüştür (51). SRY geni ise 46,XX karyotipli erkek fenotipine sahip 4 hastada, Y kromozomu üzerinde 35 kb’lık bir bölgenin araştırılması ile tanımlanmıştır (52). 1993 yılında SRY geninin, 3,8 kb büyüklüğünde intronu olmayan bir gen olduğu, merkezinde DNA-bağlayıcı HMG motifi içerdiği ve 24 kD moleküler ağırlığında 204 aminoasitlik bir proteini kodladığı tespit edilmiştir (53).

Hawkins ve ark. 46,XY dişi fenotipe sahip olan 17 hastanın 2’sinde SRY geninde mutasyon tespit ettiklerini bildirmişlerdir (54). Canto ve ark.’nın yaptıkları bir çalışmada, 2’si 46,XY, 9’u 45,X/46,XY, 3’ü 45,X/46,X,idic(Y) karyotipe sahip miks gonadal disgenezili 14 hastada SRY geninin ekzon bölgesi ile

birlikte 5'- ve 3'- bölgelerinin de dizi analizi yapılmış ve herhangi bir mutasyon saptanmadığı belirtilmiştir (55).

46,XY seks reversal hastaların %15'inde *SRY* genindeki mutasyonların dişi fenotipten sorumlu olduğu bilinmektedir (10). Bu nedenle 46,XY seks reversal hastalarda, öncelikle cinsiyetin erkek yönünde farklılaşması ve gelişiminden sorumlu olduğu bilinen *SRY* geninin delesyonlarının araştırılması ve dizi analizi ile *SRY* gen mutasyonlarının incelenmesi önem taşımaktadır.

Çalışmamızda, dişi fenotipli ve 46,XY karyotipe sahip olan hastalarımızın hiçbirinde *SRY* geninde mutasyon tespit edilmemiştir. *SRY* geninde mutasyon bulunmaması, 46,XY seks reversal hastalarda, *SRY* geninin yanısıra otozomal lokuslarda yer alan bazı genlerin de etkili olabileceğini desteklemektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda *WT1*, *SF1*, *SOX9*, *CBX2*, *WNT4*, *DMRT1*, *DHH*, *MAP3K1*, *FGF9* ve *FOXL2* gibi bazı otozomal genlerin de cinsiyet gelişiminde etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu genlerden bazılarının (*WT1*, *SF1*) *SRY* gen ekspresyonunu indüklediği ya da *SRY* geni tarafından indüklendikleri (*SOX9*) ve bu şekilde cinsiyet gelişimi üzerinde fonksiyon gösterdikleri bilinmektedir (8). 46,XY seks reversal hastalarda, *SRY* geni normal olmasına rağmen erkek cinsiyetin gelişmemesi, bu otozomal genlerde mutasyonların olabileceğini akla getirmektedir. *SRY* geninde mutasyon bulunmayan hastalarda cinsiyet gelişiminde etkisi olan diğer genlerin araştırılması gerekmektedir.

WT1 genindeki mutasyonların, 46,XY gonadal disgenezileri de içeren genitoüriner anomalilere neden olduğu ve *WT1* geninin cinsiyet belirlenmesinde önemli bir rol oynadığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (56). *WT1* geni erken

embriyo döneminde ürogenital kabarıklıkta *SF1* ile eş zamanlı eksprese olan bir transkripsiyon faktörüdür ve *WT1* proteinindeki bir kusur, gonad ve böbreklerin farklılaşmasında bozukluğa neden olmaktadır (57). *WT1* ve *SF1*'in antimüllerian hormon üzerinde düzenleyici bir etkiye sahip oldukları bilinmektedir. *WT1* mutasyonunda oluşan kusurlu protein, *SF1* ile sinerji gösterememekte ve bu durum antimüllerian hormon aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır (58). Buna bağlı olarak, *WT1* mutasyonu olan 46,XY bireylerde mülleryan kanal gelişimi izlenebilmektedir. Wilms' tümör ve renal anomalisi olmayan, ciddi hipospadias, bilateral inmemiş testis, vajinal poş ve uterusu bulunan 46,XY karyotipli bir olguda, *WT1* geninin 9. ekzonunda arginini stop kodona çeviren bir mutasyon (R390X) tespit edilmiş ve bu olgunun klinik izleminde çocukluk ve adölesan dönemde renal yetmezlik ya da Wilms' tümör gelişmediği gözlenmiştir (57). Bu olgu *WT1* mutasyonlarında Wilms' tümör gelişmeden de cinsiyet gelişim anomalisi izlenebileceğini göstermiştir.

Nordenskjöld ve ark. tarafından (1995) yapılan bir çalışmada, *SRY* geninde mutasyon bulunmayan 46,XY gonadal disgenezili 27 hastanın *WT1* geni dizi analizi sonucunda; 26 hastada herhangi bir mutasyona rastlanılmamış, buna karşın, bir hastada ise daha önce Drash Sendromunda tanımlanmış olan 8. ekzondaki bir nokta mutasyonunun heterozigot olarak saptandığı bildirilmiştir. Bu olgu klinik olarak yeniden değerlendirildiğinde, Drash sendromu ile uyumlu bulunduğu belirtilmiştir. Bu çalışma sonucunda, izole gonadal disgenezisi olan 26 hastada mutasyona rastlanılmaması ve mutasyon bulunan tek olguda Wilms'

tümör görülmesinden dolayı, Nordenskjöld ve ark. izole gonadal disgenezide *WT1* geninin majör bir rol oynamadığı fikrini öne sürmüştür (59).

Parsiyel gonadal disgenezisi olan 10 hastada yapılan bir çalışmada hastaların hiçbirinde *SRY* geninde mutasyon bulunmadığı, *WT1* geni dizi analizi sonucunda ise bir hastada heterozigot mutasyon (1186G>A) tespit edildiği belirtilmektedir. *WT1* geninde (1186G>A) mutasyonu olan olguda Wilm's tümörü hikayesi bulunduğu ve hastanın renal yetmezlik nedeniyle kaybedildiği bildirilmektedir. Bu çalışmada, *WT1* geni mutasyonunun çoğunlukla hastalarda Wilm's tümörüne neden olduğu, 46,XY gonadal disgenezinin ise tek başına ya da direkt olarak nedeni olmadığı öne sürülmüştür (11).

Köhler ve ark. tarafından (2011), 46,XY cinsiyet gelişim anomalisi ciddi/izole (hipospadias, vanishing testis sendromu) veya parsiyel/komplet seks reversal olan 210 hastaya yapılan *WT1* geninin dizi analizinde; ciddi hipospadiası olan 80 hastanın 6'sında ve vanishing testisi olan 10 hastanın birinde *WT1* geninde mutasyon tespit edilmiştir. İzole hipospadiaslı olgularda ve seks reversal olgularda ise mutasyon saptanmamıştır. Bu çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda, izole hipospadiası olan olgular dışında, tüm cinsiyet gelişim anomalilerinde *WT1* genine dizi analizi yapılması gerektiği öne sürülmektedir. *WT1* mutasyonu saptanan hastaların, çocukluk ve adölesan döneminde yapılan klinik takiplerinde bu olgulardan sadece birinde Wilm's tümör ortaya çıktığı bildirilmektedir (69). Parsiyel/komplet seks reversal olguların hiçbirinde *WT1* gen mutasyonu saptanmaması, Nordenskjöld ve ark.'nın parsiyel gonadal disgenezilerde, *WT1* mutasyonu tespit etmedikleri çalışmayı desteklemektedir (59).

WT1 gen mutasyonları, Wilms' tümör ve Fraiser Sendromu, Drash Sendromu gibi sendromlara eşlik eden genital anomalilere neden olabileceği gibi, cinsiyet gelişim anomalilerine de neden olabildiği için; izole hipospadias dışındaki tüm cinsiyet gelişim anomalilerinde, 46,XY seks reversal olgularda, renal anomali ya da Wilm's tümörü eşlik etmese dahi, *WT1* geninin dizi analizi yapılmasının uygun olduğu düşünülmektedir (59).

Çalışmamızda *SRY* geni intakt olan 10 olguda yaptığımız *WT1* gen dizi analizinde bugüne kadar tanımlanan patojenik mutasyonların hiçbirine rastlanmamakla birlikte, *WT1* geninin 1, 7 ve 10. ekzonlarında daha önce polimorfizm olarak tanımlanmış olan değişiklikler izlenmiştir. Bulunan bu polimorfizmler ve minör allel frekansları (Global minor allele frequency =MAF) Tablo 4.2'de gösterilmektedir. Araştırmamızda izole 46,XY komplet seks reversal hastalarda *WT1* geninde mutasyon bulunmaması, Köhler ve ark. ile Nordenskjöld ve ark.'nın sonuçları ile uyumlu görülmektedir.

Literatürde, şüpheli genitalya ile seks reversal arasında değişen şiddetlerde fenotip gösteren, 9. kromozomun p kolunun ve 10. kromozomun q kolunda terminal delesyonu ve X kromozomunun p21-p22 bölgesinde duplikasyonu olan olgular bildirilmiştir. 10. kromozomun q kolunda terminal delesyonu olan 8 erkek hastanın 2'sinde şüpheli genitalya, diğer 6'sında inmemiş testis, mikropenis ve hipospadiasın değişik kombinasyonlarda görüldüğü bildirilmiştir (60). Chung ve ark.(1998) tarafından fetal USG'de ciddi intrauterin gelişme geriliği, konjenital kalp hastalığı ve tek umblikal arter izlenen bir olgunun amniyon mayiinden yapılan kromozom analizinde; olgunun 46,XY karyotipine sahip olduğu, ancak

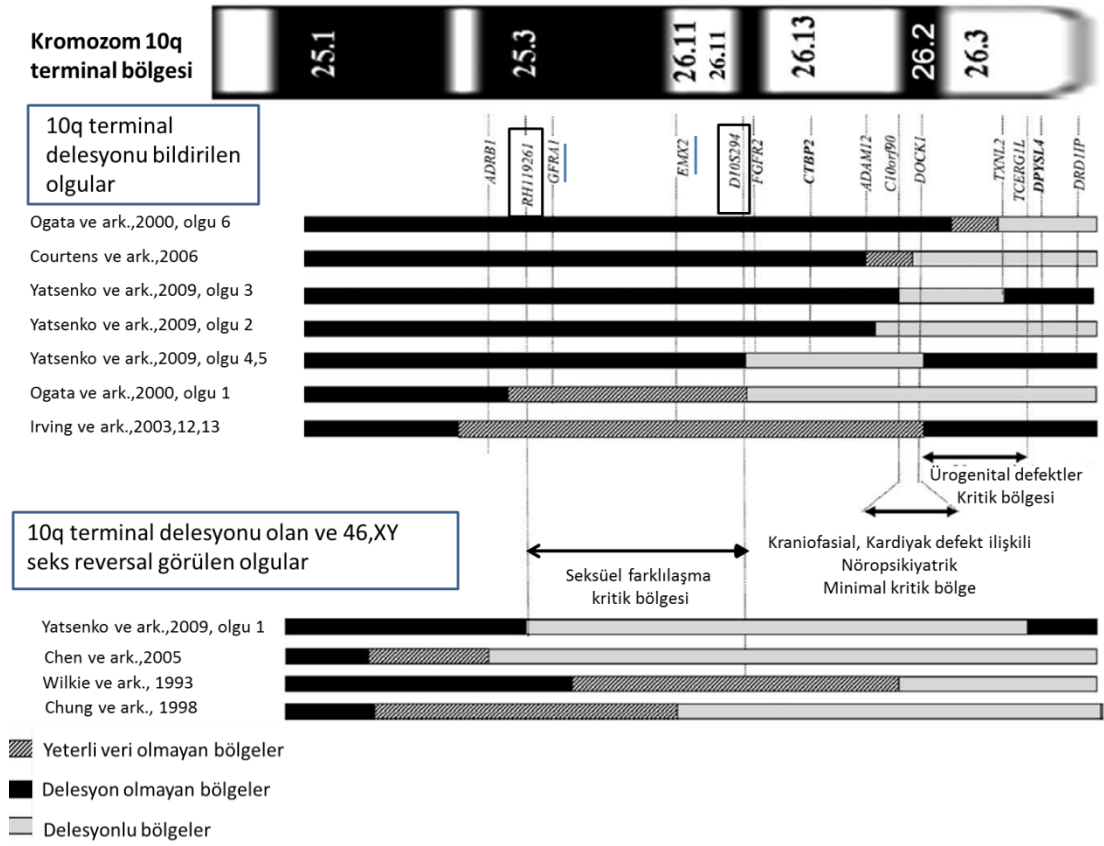
10. kromozomun q25-qter bölgesinde delesyon saptandığı bildirilmiştir (3). Bu olguda dışı dış genitalyanın varlığı nedeniyle yapılan *SRY* geninin moleküler analizi neticesinde *SRY* geninin intakt olduğunun belirlenmesi üzerine, araştırmacılar tarafından fenotipten 10q25-qter delesyonun sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (3).

Wilkie ve ark. tarafından 46,XY karyotipli, mental retardasyon, birçok fenotipik anomali ve anormal genitalyası olan iki olguda 10. kromozomun q kolunda delesyon saptanmıştır. Bu olgulardan 10. kromozomun q26.1 bölgesinde izole delesyon saptanan hastada, dışı dış genitalya görülmüştür. İkinci olguda, ebeveynde bulunan 10 ve 16. kromozomlar arasında translokasyondan kaynaklanan dengesiz gamet oluşumu nedeniyle derivatif kromozom [46,XY,-10,+der(10)t(10;16)(q26.2;q21)] saptanmış ve bu olguda şüpheli genitalya görülmüştür. Bu olgulardan yola çıkarak 10. kromozomun q terminal delesyonlarının erkek cinsiyet gelişimiyle güçlü bir ilişkisi olduğu öne sürülmüş ve erkek cinsiyet gelişim anomalilerinde araştırılması gerektiği vurgulanmıştır (60).

Yatsenko ve ark.(2009) tarafından, daha önce karyotip analizi ya da FISH analizi ile 10. kromozomun q kolunda terminal delesyon saptanmış 5 olguya array çalışması yapılmıştır (61). Yatsenko ve ark. bu olgulardan sadece birinde, şüpheli genitalya ve parsiyel seks reversal olduğunu ve 10. kromozomun q25.3-26.1 bölgesinde delesyon bulunduğunu bildirmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, araştırmacılar tarafından 10. kromozomun q kolunun terminal delesyonu olan seks reversal hastalarda 10q24-26.1 bölgesinde bulunan, Paired box gene 2 (*PAX2*)

(10q24.3-q25.1), Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha 1 (*GFRA1*) (10q25.3), Empty spiracles, drosophila homolog 2 (*EMX2*) (10q26.11), ve Fibroblast growth factor receptor 2 (*FGFR2*) (10q26.12) genleri aday gen olarak belirlenmiş ve bu hastalarda etiyolojiden bu genlerin sorumlu olduğu öne sürülmüştür. Yatsenko ve ark., array analizi yaptıkları 5 olguda, saptadıkları delesyonları ve bu olguların klinik bulgularını göz önünde bulundurarak, 10. kromozomun q kolunun terminalinde bulunan RH119261- D10S294 (10q25.3-q26.12) bölgesini seks reversal için kritik bölge olarak tanımlamış ve bu bölgede yer alan *EMX2* ve *GFRA1* genlerinin cinsiyet gelişiminden sorumlu aday genler olduğunu ileri sürmüşlerdir (Şekil 5.1). Yatsenko ve ark. tarafından tanımlanan kritik bölgeler, yüksek çözünürlüklü moleküler çalışmalara (array) dayanarak belirlenmiş ve bu nedenle kritik bölgeler belirlenirken, daha önce bildirilmiş olan ve array yapılmayan olguların delesyon bölgeleri göz önüne alınmamıştır (61).

Literatürde 9p21-pter (Jotterand ve ark.1976), 9p22.1-pter (Fryns ve ark.,1986) 9p23-pter (Crocker ve ark.,1988, Ogata ve ark.,1997), 9p24.1-pter (Vinci ve ark.,2007) ve 9p24.2-pter (Veltia ve ark.1998) delesyonları bulunan olgularda şüpheli genitalya bildirilmiştir. Son yıllarda Quinonez ve ark. (2013) tarafından 46,XY karyotipe sahip 9p24.1 delesyonu bulunan iki olgu daha bildirilmiştir. Birinde şüpheli genitalya diğerinde komplet seks reversal izlenen bu olgularda, 9p24.1 üzerinde lokalize olan *DMRT1* gen delesyonunun anormal cinsiyet gelişimine neden olduğu düşünülmüştür (62).



Şekil 5. 1. Yatsenko ve ark. tarafından bildirilen 10q terminal delesyonlu 5 olgu ile literatürde daha önce bildirilmiş olan 10q terminal delesyonlu olguların delesyon bölgeleri ve belirlenen kritik bölgeler

X kromozomunun p21-23 duplikasyonuna sahip olduğu bilinen 46,XY seks reversal olgular literatürde bildirilmektedir. Bardoni ve ark. (1994) tarafından yapılan bir derlemede literatürde bildirilmiş Xp parsiyel duplikasyonu olan 8 olgunun dişi yada şüpheli genitalyaya sahip olduklarını bildirmiştir (34). Araştırmacılar tarafından Xp21 lokusunda 160 kb'lik bir bölgenin duplikasyonunun 46,XY seks reversala neden olduğu öne sürülmüştür. Daha

sonra yapılan çalışmalarla *DAX1* geninin bu lokusta bulunduğu ve duplikasyonlarının 46,XY seks reversala neden olduğu bulunmuştur (15, 34).

Submikroskobik delesyon ve duplikasyonların tanımlanması amacıyla kullanılan “Array Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonu (Comparative Genomic Hybridization CGH)”, tekniğinin, sendromik gonadal disgenezilerin %25’inin, non-sendromik gonadal disgenezilerin %5,6’sının etiyolojik nedenini ortaya çıkarılabildiği öne sürülmektedir (63).

Ledig ve ark. (2010), sendromik ya da nonsendromik 46,XY gonadal disgenezisi olan 87 olguda, submikroskobik delesyon ve duplikasyonları saptamak amacıyla yaptıkları oligonükleotid array (Agilent) analizinde, gonadal disgenezilere neden olduğu bilinen *DMRT1*, *SOX9*, *DAX1* genlerini de içeren önceden belirlenmiş kayıp ve kazançlar tespit etmişlerdir. Bunların dışında, XY gonadal disgeneziler için birçok aday kromozomal bölge bildirmişlerdir (Tablo 5.1).

Norling ve ark. (2013) tarafından, 46,XY cinsiyet gelişim anomalisine sahip 9 olguda, cinsiyet gelişiminde etkisi olduğu bilinen 78 geni de içeren Array-CGH platformu kullanılarak,, tüm genom array analizi yapılmış ve bu analizler sonucunda 2 hastada Suppressor of Ty 3 homolog (*S. cerevisiae*) (*SUPT3H*) (6p21.1), Chromosome 2 open reading frame 83 (*C2ORF80*) (2q34), Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta (*PIP5K1B*) (9q21.11), Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, gamma (*PRKACG*) (9q21.11), ve Family with sequence similarity 189, member A2 (*FAM189A2*) (9q21.11) genleri aday gen olarak belirlenmiştir. Belirlenen genlerin, testiküler dokuda eksprese

oldukları ve fare deneylerinde gonadal disgeneziye neden oldukları bilinmektedir (49).

Araştırmamızın sonucunda Norling ve ark.'nın çalışması ile ortak bir bölge bulunmazken Ledig ve ark.'nın bildirdiği aday bölgelerden biri olan 8. kromozomun q24.3 bölgesi, çalışmamızda hem Olgu 1'de hem Olgu4'de kazanç saptanmış olan tek ortak bölge ile örtüşmektedir. Ledig ve ark. 8. kromozomun q24.3 bölgesinde 3,817 Mb büyüklüğünde bir kazanç saptamışlar ve bu bölgede lokalize olan genlerin XY gonadal digenezi gelişiminden sorumlu olan aday genler olduklarını belirtmişlerdir (63).

Tablo 5.1. Literatürde bildirilen gonadal disgenezili olgulara yapılan array analizi sonucunda belirlenen aday kromozom bölgeleri ve bizim çalışmamızdaki olguların array analizi sonucunda görülen değişiklikler

Kromozom bölgesi	Başlangıç bölgesi- Bitiş bölgesi	Kayıp/ Kazanç	Ledig ve ark.(2010) olgu sayısı n=87	Norling ve ark. (2013) olgu sayısı n=14	Bizim çalışmamızdaki olgu sayısı n=10
1p36.32	2694355-3167922	Kazanç	1		
1q21.2	147065130-147353398	Kayıp			1(Olgu2)
2p16.1	54990975-55087598	Kazanç	1		
2q34	208743127-208765512	Kayıp		1	
2q37.1	233178980-233412564	Kazanç			1 (Olgu2)
3q26.31	174296433-174506577	Kayıp	1		
3q27.3	186568501-16629141	Kazanç			1 (Olgu 4)
4q12	57359930-57572181	Kazanç	1		

4q21.1	78090456-78432861	Kazanç		1 (Olgu 8)
4q35.2	187504814-187761728	Kazanç	1	
5p15.33	1212658-1645795	Kayıp	1	
6p21.1	44996834-45215062	Kazanç		1
6p22.2	24433564-24609197	Kazanç	1	
6q15	89449946-89737643	Kazanç		1 (Olgu 6)
7q11.21	57881351-62759719	Kazanç		1 (Olgu 6)
7q11.23	74145357-74391436	Kayıp		1 (Olgu 2)
8p11.1	16629141-16853072	Kazanç		1 (Olgu 4)
8p11.22	39226335-39388919	Kazanç		1 (Olgu 5)
8q24.3	142274733-146092035/ 144308962-145817594	Kazanç	1	2 (Olgu 1, Olgu4)
9p21.3	20992666-21192369	Kayıp	1	
9q21.32	85466180-85658965	Kazanç	1	
9q31.2	107403144-107575411	Kazanç	1	
9q21.11	70736778-71197088	Kazanç		1
10q11.23	50764788-51264692	Kazanç	1	
10q21.3	67103959-67499226	Kazanç	1	
10q26.3	135218338-135428108/ 135252931-135426389	Kazanç		1 (Olgu3, Olgu 10)
11p15.4	16629141-16853072	Kazanç		1 (Olgu 4)
11q14.1	78361133-78778557	Kazanç		
12q24.11	108043263-108142585	Kazanç	1	
12q24.13-q24.21	112762082-113002746	Kazanç	1	

12q21.31	79153498- 79256353	Kayıp	1	
13q21.1-q21.2	57009787- 57659539	Kazanç	1	
14q32.33	106251486- 106740452/ 106313767- 106736227/ 106020554- 106736227	Kazanç		3 (Olgu 7, Olgu 8, Olgu 9)
16p11.2	34490200- 34744260/ 34448198- 34795780	Kazanç		2 (Olgu 3, Olgu 7)
17p11.2	17439501- 17656768	Kazanç		1 (Olgu 2)
17q12	29356051- 29446047	Kayıp	1	
20p13	940665- 1109400	Kazanç	1	
21q21.1	15913926- 16060366	Kazanç	1	
21q22.11	31014008- 31163085	Kazanç	1	
Xp11.22	49848727- 50356530	Kazanç	1	
Xp22.33	1211483- 1415914	Kayıp		1 (Olgu 3)
Yq11.22	22216931- 22516184	Kazanç		1 (Olgu 8)

Tablo 5. 2. Olgu 1, Olgu 4 ve Ledig ve ark.'nın çalışmasındaki Olgu 20'ye ait 8. kromozomun q24.3 bölgesinde array analizi sonucunda bulunan duplikasyonların başlangıç-bitiş bölgeleri ve belirlenen aday genler

	Kromozomal bölge	Kayıp/ Kazanç	Başlangıç-Bitiş	Genler
Olgu 1	8q24.3	Kazanç	144238010-145751248	<i>LY6H, GPIHBP1, ZFP41**</i> , <i>GLI4**</i> , ZNF696, <i>TOP1MT**</i> , C8ORF51, <i>RHPN1**</i> , MAFA, <i>ZC3H3**</i> , GSDMD, C8ORF73, NAPRT1, <i>EEF1D</i> , <i>TIGD5**</i> , <i>PYCRL**</i> , <i>TSTA3**</i> , ZNF623, ZNF707, <i>BREA2**</i> , LOC100130274, MAPK15, <i>FAM83H*</i> , LOC100128338, SCRIB, MIR937, <i>PUF60**</i> , NRBP2, EPPK1, <i>PLEC*</i> , MIR661, PARP10, GRINA, SPATC1, OPLAH, EXOSC4, GPAA1, CYC1, SHARPIN, MAF1, KIAA1875, C8ORF30A, HEATR7A, SCXB, SCXA, BOP1, HSF1, DGAT1, SCRT1, C8ORFK29, FBXL6, GPR172A, ADCK5, CPSF1, MIR939, MIR1234, <i>SLC39A4*</i> , VPS28, NFKBIL2, CYHR1, KIFC2, FOXH1, PPP1R16A, GPT, MFSD3, <i>RECQL4*</i> , LRRC14, LRRC24
Olgu 4	8q24.3	Kazanç	144308962-145819962	<i>ZFP41**</i> , <i>GLI4**</i> , ZNF696, <i>TOP1MT**</i> , C8ORF51, <i>RHPN1**</i> , MAFA, <i>ZC3H3**</i> , GSDMD, C8ORF73, NAPRT1, <i>EEF1D</i> , <i>TIGD5**</i> , <i>PYCRL**</i> , <i>TSTA3**</i> , ZNF623, ZNF707, <i>BREA2**</i> , LOC100130274, MAPK15, <i>FAM83H*</i> , LOC100128338, SCRIB, MIR937, <i>PUF60**</i> , NRBP2, EPPK1, <i>PLEC*</i> , MIR661, PARP10, GRINA, SPATC1, OPLAH, EXOSC4, GPAA1, CYC1, SHARPIN, MAF1, KIAA1875, C8ORF30A, HEATR7A, SCXB, SCXA, BOP1, HSF1, DGAT1, SCRT1, C8ORFK29, FBXL6, GPR172A, ADCK5, CPSF1, MIR939, MIR1234, <i>SLC39A4*</i> , VPS28, NFKBIL2, CYHR1, KIFC2, FOXH1, PPP1R16A, GPT, MFSD3, <i>RECQL4*</i> , LRRC14, LRRC24, MGC70857, ARHGAP39
Ledig ve ark. Olgu 20	8q24.3	Kazanç	142274733-146092035	<i>FLJ43860</i> , GPR20, LOC731779, PTP4A3, BAI1, LINC00051, MIR4472-1, TSNARE1, ARC, BAI1, C8ORF55, <i>JRK*</i> , LOC100288181, LY6D, LY6K, LYNX1, LYPD2, PSCA, <i>SLURP1*</i> , <i>CYP11B1*</i> , <i>CYP11B2*</i> , C8ORF31, LY6H, C8ORF51, <i>GLI4</i> , <i>GPIHBP1</i> , LY6H, MAFA, <i>RHPN1</i> , <i>TOP1MT</i> , <i>ZC3H3</i> , <i>ZFP41</i> , <i>ZNF696</i> , <i>NAPRT1</i> , <i>EEF1D</i> , <i>TIGD5</i> , <i>PYCRL</i> , <i>TSTA3</i> , <i>ZNF623</i> , <i>ZNF707</i> , <i>BREA2</i> , <i>LOC100130274</i> , <i>MAPK15</i> , <i>FAM83H*</i> , <i>LOC100128338</i> , <i>SCRIB</i> , <i>MIR937</i> , <i>PUF60</i> , <i>NRBP2</i> , <i>EPPK1</i> , <i>PLEC*</i> , <i>MIR661</i> , <i>PARP10</i> , <i>GRINA</i> , <i>SPATC1</i> , <i>OPLAH</i> , <i>EXOSC4</i> , <i>GPAA1</i> , <i>CYC1</i> , <i>SHARPIN</i> , <i>MAF1</i> , <i>KIAA1875</i> , <i>C8ORF30A</i> , <i>HEATR7A</i> , <i>SCXB</i> , <i>SCXA</i> , <i>BOP1</i> , <i>HSF1</i> , <i>DGAT1</i> , <i>SCRT1</i> , <i>C8ORFK29</i> , <i>FBXL6</i> , <i>GPR172A</i> , <i>ADCK5</i> , <i>CPSF1</i> , <i>MIR939</i> , <i>MIR1234</i> , <i>SLC39A4*</i> , <i>VPS28</i> , <i>NFKBIL2</i> , <i>CYHR1</i> , <i>KIFC2</i> , <i>FOXH1</i> , <i>PPP1R16A</i> , <i>GPT</i> , <i>MFSD3</i> , <i>RECQL4*</i> , <i>LRRC14</i> , <i>LRRC24</i> , <i>MGC70857</i> , <i>ARHGAP39</i> , C8ORF82, FAM203A, RPL8, TONSL, ZNF251, ZNF34, ZNF517, ZNF7

Altı çizili genler, Ledig ve. ark.'nın bir olgusu ve bizim 2 olgumuzda tespit edilen ortak duplikasyon bölgesinde bulunan genlerdir.

*Ledig ve ark.'nın aday gen olarak bildirdiği genler (63)

**Çalışmamızda belirlediğimiz aday genler

Ledig ve ark., Jerky Mouse homolog (*JRK*), Secreted ly6/plaur domain-containing protein 1 (*SLURP1*), Cytochrome p450, subfamily xib, polypeptide 1 (*CYP11B1*), Cytochrome p450, subfamily xib, polypeptide 2 (*CYP11B2*), Family with sequence similarity, member H (*FAM83H*), Plectin 1 (*PLEC1*), Solute carrier family 39 member 4 (*SLC39A4*) ve RECQ protein-like 4/ATP-Dependent DNA Helicase Q4 (*RECQL4*) genlerini aday gen olarak göstermişlerdir. Ledig ve ark.'nın 8. kromozomun q24.3 bandında duplikasyon tespit ettikleri 3,817 Mb'lık bölge, çalışmamızda Olgu 1'de 1,513 Mb'lık, Olgu 4'de 1,508 Mb'lık kazanç saptanan bölgeleri kapsamaktadır. Ledig ve ark.'nın olgusunda ve bizim olgularımızda tespit edilen ortak duplikasyon bölgesi ve içerdikleri genler Tablo 5.2'de gösterilmiştir.

İki olgumuzda saptadığımız ve Ledig ve ark.'nın olgusunda da ortak duplikasyon bölgesinde bulunan *FAM83H*, *PLEC1*, *SLC39A4* ve *RECQL4* genleri, Ledig ve ark. tarafından aday gen olarak belirlenmiştir. Ancak bu genlerin neden aday olarak seçildiğine dair bir açıklama yapılmamıştır. Bu genler tek tek değerlendirildiğinde;

FAM83H geni, diş minesinin kalsifikasyon ve yapısal gelişiminde rol oynayan bir gen olup, Amelogenesis imperfekta (OMIM:130900)'dan sorumlu olduğu bilinmektedir. Asya popülasyonunda, *FAM83H* genini de içeren bölgenin duplikasyonunun %3,2 sıklıkta görüldüğünü gösteren bir çalışma bulunmakta ve ve bu oran polimorfizm lehine değerlendirilmektedir (50).

PLEC1 geni, “plectin 1” proteinini kodlamakta ve kollajen biyosentezi, enzim modifikasyonu, hücre-hücre junction organizasyonu, hücre iskeletinin

nörofilamentler ve keratin filamentlerle yeniden şekillenmesinde rol oynamaktadır (49). *Plec1* geni için yapılan fare deneylerinde, bu genin homozigot mutasyonlarının letal olduğu bildirilmektedir. İnsanda epidermolizis büllosanın çeşitli alt tiplerinde (OMIM 612138, 131950 ve 226670) ve Limb Girdle Muskuler distrofi Tip 2Q (OMIM 613723)'da *PLEC1* gen mutasyonları görülmektedir. DGV verilerine göre, yapılan populasyon çalışmalarında, %3,2'den %11'e kadar değişen sıklıkta *PLEC1* geninin bulunduğu bölgede duplikasyonlar bildirilmekte ve varyasyon olarak değerlendirilmektedir.

SLC39A4 geni, "Zinc/iron-regulated transporter-like protein (ZIP)"i kodlamakta ve bu protein membranda yer alarak özellikle intestinal sistemde çinko transportunda rol almaktadır (49). *SLC39A4* geni ençok ince bağırsak ve pankreas dokusunda olmak üzere vücuttaki tüm dokularda eksprese olmaktadır. *SLC39A4* geni mutasyonlarının, Acrodermatitis Enteropathica'ya (OMIM 201100) neden olduğu belirtilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda pankreas kanserleri ile de ilişkili bulunmuştur (67). DGV verilerine göre, *SLC39A4* genini de içeren bölgenin duplikasyonu farklı çalışmalarda %1,5 ile %3,2 arasında izlenmiş ve polimorfizm olarak değerlendirilmiştir (50).

RECQL4 geni, RECQ4 helikaz ailesinin üyesi olan bir DNA helikaz proteini kodlamaktadır. Bu genin homozigot mutasyonlarının fare modellerinde letal olduğu, yaşayanlarda ise cilt ve iskelet defektleri ve kanser riskinde artış görüldüğü belirtilmektedir (34). İnsanda *RECQL4* geni, baskın olarak timüs ve testiste olmakla birlikte hemen hemen tüm dokularda eksprese olmaktadır. Baller-Gerold Sendromu (OMIM 218600), RAPADILINO Sendromu (OMIM 266280),

Rothmund- Thomson Sendromu (OMIM 268400)'nda *RECQL4* geninin mutasyonları görülmektedir. Asya populasyonunda yapılan bir çalışmada *RECQL4* geni duplikasyonunun, %6,4 sıklıkta görüldüğü bildirilmekte ve varyasyon olarak değerlendirilmektedir (50).

İki bağımsız çalışmada benzer klinik bulgulara sahip toplam 3 gonadal disgenezi hastasında, *FAM83H*, *PLEC1*, *SLC39A4* ve *RECQL4* genlerinin bulunduğu, 8. kromozomun q24.3 bölgesinde duplikasyon belirlenmesi, seks reversal etiyolojisinde 8. kromozomun q24.3 bölgesinin sorumlu olabileceğini düşündürmekle birlikte, bu genlerin duplikasyonlarının DGV'de referans gösterilen çalışmalarda polimorfizm olarak değerlendirildiği görülmektedir.

Çalışmamızda iki olguda duplikasyon saptanan 8q24.3 bölgesinde bulunan ortak genler elektronik veritabanları yardımıyla analiz edilmiştir. Ledig ve ark.'nın olgularında ve iki olgumuzda duplikasyon saptanan ortak bölgede bulunan Zinc Finger Protein 41 (*ZFP41*), Gli-Kruppel family member 4 (*GLI4*), Topoisomerase 1 mitochondrial (*TOP1MT*), Rhophilin, Rho GTPase Binding Protein 1 (*RHPN1*), Zinc Finger, C3HC-Type Containing 1 (*ZC3HC*), Tigger transposable element derived 5 (*TIGD5*), Pyrroline-5-carboxylate reductase-like (*PYCRL*), Tissue specific transplantation antigen P35B (*TSTA3*), Breast cancer estrogen-induced apoptosis 2 (*BREA2*) ve Poly-U binding splicing factor 60KDa (*PUF60*) genlerinin kayıp ya da kazançları ile ilgili yeterli veri, veri tabanlarında bulunmamakla birlikte, Xu ve ark. (2011) tarafından sağlıklı bireylerde yapılan bir array çalışmasında bu bölgenin duplikasyonunun 6553 kişiden sadece birinde görülmesi, bu bölgenin polimorfizm olmadığını ve içerdiği genlerin aday gen

olabileceklerini düşündürmektedir (50). 8. kromozomun q24.3 bölgesinde bulunan diğer genler elektronik veritabanlarında değerlendirilmiş ve bu genlerin duplikasyonlarının sağlıklı bireylerde yapılan çeşitli çalışmalarla polimorfizm oldukları gösterilmiştir (50).

Ledig ve ark., 8. kromozomun q24.3 bölgesinde bulunan, gonadal disgenezi için aday gösterdikleri genleri veritabanlarından elde edilen verilere göre belirlediklerini bildirmekle birlikte bizim aday gen olarak gösterdiğimiz *ZFP41*, *GLI4*, *TOP1MT*, *RHPN1*, *ZC3HC*, *TIGD5*, *PYCRL*, *TSTA3*, *BREA2* ve *PUF60* genleri üzerinde durmamışlardır. Bu genlerden özellikle *ZFP41* geninin testis, over ve dişi genital yapıların da dahil olduğu birçok dokuda (beyin, böbrek, kulak, retina vb.) eksprese olduğu ve transkripsiyonun düzenlenmesinde, spermatogenez ve hücre differansiasyonunda rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu genin homozigot mutasyonlarının fare modellerinde letal olduğu, yaşayanlarda ise cilt ve iskelet defektleri ve kanser riskinde artış görüldüğü belirtilmektedir (34, 49). *ZFP41* geninin hücre diferansiasyonunda ve spermatogenezde rol oynaması nedeniyle cinsiyet gelişiminde ve gonad farklılaşmasında etkili bir gen olabileceğini düşünmekteyiz. İleride yapılacak çalışmalar *ZFP41* geninin cinsiyet gelişiminde etkili olup olmadığının gösterilmesi açısından önem taşımaktadır.

Biason-Lauber ve ark. (2009) tarafından bildirilen 46,XY seks reversal bir hastanın, intrauterin dönemde ileri maternal yaş nedeniyle yapılan amnion mayiinde kromozom analizi neticesinde 46,XY karyotip saptanmış, ancak doğumda dişi fenotip ve normal histolojik yapıda over dokusu izlendiği

bildirilmiştir (65). Etiyolojiyi aydınlatmak amacıyla, hastada öncelikle *SOX9*, *SF1*, *DAX1* ve *SRY* genleri mutasyonlar açısından araştırılmış ve herhangi bir anomali saptanmaması üzerine, daha önce fare deneyleri ile aday gen olarak belirlenen *CBX2* geninin moleküler analizinde ekzon 5'te 2 farklı mutasyon (bileşik heterozigot) varlığı tanımlanmıştır. Bu hasta, literatürde *CBX2* geninde mutasyon tanımlanan tek seks reversal olgu olmakla birlikte, farelerde yapılmış olan deneysel çalışmaların sonuçlarını da desteklemektedir (65).

Fare deneylerinde *Cbx2* gen kaybının, sadece XY farelerde seks reversal fenotipe neden olmadığı, XX farelerde de gonadal gelişimi engellediği ve germline instabiliteye neden olduğu gösterilmektedir (65). Ayrıca Katoh-Fukui ve ark. (2011), *Cbx2* homozigot knock-out farelerde testislerin hipoplazik olduğunu belirtmekte ve *Cbx2*'nin testis farklılaşmasında *SRY*'nin ekspresyonunu düzenlediğini ileri sürmektedir (30). *CBX2* proteini, histon modifikasyonu ile kromatin yapının düzenlenmesinde görevli bir polycomb proteindir. Bu epigenetik modifikasyon, normal hücre proliferasyonu ve gelişimin kontrolünden sorumlu genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde gerekmektedir. *Cbx2* geni knock-out olan farelerin %50'si için letal iken, yaşayanlarında adrenogenital ve dalak gelişiminde defektler olduğu görülmüştür. *Sry* geni intakt olan XY, *Cbx2* homozigot mutant olan farelerde dişi fenotip özellikleri görülmüş fakat steril oldukları bildirilmiştir. Bu farelerde gonadlar incelendiğinde hem foliküller içeren overler, hem de testiküler ve ovaryen dokunun birlikte görüldüğü gonad yapısı görülmüştür. *Cbx2* homozigot knock-out farelerde, *Sox9* ekspresyonunun azalması, *Cbx2*'nin *Sry* geninin regülasyonunda rol oynadığını desteklemiştir.

Ayrıca insanda *CBX2*'nin adrenal gelişimde *SF1* ekspresyonunu düzenlediği bulunmuştur (65). Bu çalışmalar, *CBX2*'nin erkek gonad gelişiminde etkili olduğunu desteklemektedir.

XX karyotipli *Cbx2* geni homozigot knock-out farelerde, ya küçük overler olduğu ya da overlerin gelişmediği görülmüştür. *Cbx2* knock-out oositlerde, mayotik kromozom yapısında hasar görülmesi, *Cbx2*'nin dişi germ hücrelerinde yapısal stabilitenin korunmasında görevli olduğunu desteklemiştir. Ayrıca XX karyotipli farede, *Cbx2*'nin X inaktivasyonunda önemli olduğu öne sürülmüştür (64). Bu çalışmalar *CBX2*'nin dişi gonadal gelişiminde de etkili olduğunu göstermektedir.

Norling ve ark.'nın (2013) fare deneylerine ve literatürde bildiren tek olguya dayanarak yaptığı çalışmada, 46,XY ve 46,XX karyotipe sahip gonadal disgenezisi olan 47 hastada *CBX2* geni mutasyon analizi sonucunda sadece 9 SNP (dbSNP) ve 1 insersiyon tespit edildiği belirtilmektedir (Tablo 5.3.) (65). Bildiğimiz kadarı ile bu çalışma, *CBX2* geninin insanda araştırıldığı tek çalışmadır.

Çalışmamızda 46,XY seks reversal olguların tümüne yapılan *CBX2* geninin dizi analizinde; Olgu 1, 3 ve 6'da herhangi bir değişiklik gözlenmezken, Olgu 2, 4, 7, 8, 9 ve 10'da *CBX2* geninin 5. ekzonunda MAF değeri 0,37 olan SNP (c.1553G>A (rs3751957)) ve Olgu 5'te 5. ekzonda MAF değeri 0,24 olan SNP (c.1242G>A (rs3751956)) tespit edildi (Tablo 5.3). Belirlenen SNP'ler, Ensembl ve dbSNP veri tabanlarından kontrol edildiğinde bu değişikliklerin daha önce tanımlanmış varyant değişiklikler oldukları gösterildi (Tablo 5.3)

Tablo 5. 3. Norling ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada ve bizim çalışmamızda *CBX2* geninin dizi analizinde bulunan SNP'ler

SNP	MAF/MAC	Lokalizasyon	Nükleotid değişikliği	Norling ve ark.'nın çalışmasında görülen olgu sayısı n=47	Bizim çalışmamızda görülen olgu sayısı n=10
rs71368052	C=0.110/240	Promotor	c.-52C>G	G/G=45	-
rs150471517	Veri yok	İntron 1	c.72+37G>A	G/A=3	-
rs56050112	C=0.230/503	İntron 1	c.73-36T>C	T/C=16 C/C=3	-
rs35124694	T=0.015/33	Ekzon 3	c.147C>T	C/T=4	-
rs72231015	Veri yok	İntron 3	c.182+20_182 +21insTG	-/TG=9 TG/TG=3	-
rs113561509	C=0.013/28	İntron 4 (3'UTR)	c.288+666G> C	G/C=2	-
rs3751956	A=0.247/540	Ekzon 5	c.1242G>A	G/A=20 A/A=10	A/A=1
rs199566347	A=0,01/4	Ekzon 5	c.1356G>A	G/A=1	-
rs141957173	G=0,01/2	Ekzon 5	c.1411C>G	C/G=1	-
rs3751957	A=0.372/815	Ekzon 5	c.1449G>A	G/A=17 A/A=1	G/A=6

CBX2 geni için insanda yapılan yeterli çalışma olmaması, bu gen için daha çok olgunun analiz edilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Fare deneylerine dayanarak ve literatürdeki tek olgunun henüz erişkin yaşa ulaşmaması ve infertil olup olmadığının bilinmemesi nedeniyle, sadece infertilite şikayeti olan hastalarda *CBX2* geninin etyolojide rol oynayabileceği görülmektedir (66).

Yapılan tüm bu çalışmalar ışığında, *CBX2* geninin etkilerini daha iyi anlamak için sadece seks reversal hastalarda değil gonadal disgenezi, infertilitesi ve primer ovaryen yetmezliği olan tüm olgularda *CBX2* geni analizinin yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Olgu sayısı artırılarak yapılacak daha geniş çalışmaların *CBX2* gen mutasyonlarının cinsiyet gelişimindeki rolü ve fenotipin daha iyi anlaşılmasında faydalı olacağı kanaatindeyiz.

6. SONUÇ

Cinsiyet gelişim anomalilerinden sorumlu olan genlerin bazıları biliniyor olmakla birlikte, hastaların ancak %20'sine moleküler yöntemlerle tanı konulabilmektedir. Dolayısı ile henüz bilinmeyen ancak bu durumdan sorumlu yeni gen/genler olduğu aşıkardır.

46,XY seks reversal hastalarda, tanıya giderken öncelikle bu hastalığın %15'inden sorumlu olduğu bilinen *SRY* geni mutasyonları araştırılmalı ve mutasyon saptanmayan hastalarda gonadal disgeneziye neden olduğu bilinen *WT1*, *SF1*, *SOX9*, *DAX1*, *DHH*, *MAP3K1*, *WNT4*, *CBX2* genleri değerlendirilmelidir. Çalışmamızda 10 olgunun *SRY*, *WT1* ve *CBX2* genlerine dizi analizi yapılmış ve patojenik mutasyon saptanmamıştır.

Array sistemlerinin, sendromik gonadal disgenezilerin %25'nin, non-sendromik gonadal disgenezilerin %5,6'sının etiyolojik nedenini ortaya çıkardığı öne sürülmektedir. 46,XY seks reversala neden olduğu bilinen genlerde araştırma yapıldıktan sonra array sistemlerinin kullanılması delesyon/duplikasyonların ve yeni gen/genlerin ortaya çıkmasını sağlayabilecektir.

Yapılan çalışmada bütçenin yetersiz olması nedeniyle hasta sayısı sınırlı tutulmuş ve hastaların ebeveynlerine array analizi yapılamamıştır. Bu çalışmada yapılan array analizi sonucunda; iki olguda 8. kromozomun 24.3 bölgesinde duplikasyon saptanmış ve aynı bölgenin duplikasyonu daha önce de gonadal disgenezili bir olguda bildirilmiştir. Bu nedenle seks reversal için, 8. kromozomun q24.3 bölgesinin yeni bir aday kromozom bölgesi olabileceği düşünülmüştür. Bu bölgede bulunan tüm genler, Genecards, HGMD ve DGV veritabanlarında

değerlendirilmiştir. 8. kromozomun q24.3 bölgesinde bulunan, polimorfik olmayan ve hakkında yeterli veri bulunmayan başta spermatogenez ve hücre farklılaşmasında rol alan *ZFP41* geni olmak üzere, *GLI4*, *TOP1MT*, *RHPN1*, *ZC3HC*, *TIGD5*, *PYCRL*, *TSTA3*, *BREA2* ve *PUF60* genlerinin seks reversal için aday gen olabileceği düşünülmüştür. Yapılacak ileri çalışmalarla bu genlerin cinsiyet gelişimindeki etkileri daha iyi anlaşılabacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile 46,XY seks reversalin etiolojisinde cinsiyet kromozomları dışında, otozomal genleri de kapsayan birçok genetik faktörün etkili olduğu ve 46,XY seks reversal hastalarda etiolojinin ortaya çıkarılabilmesi için bilinen genlerin taranmasının yanı sıra yeni genlerin olabileceği unutulmamalıdır. Tüm ekzom dizileme yönteminin gelişen teknoloji ve maliyetinin gün geçtikçe azalması nedeni ile seks reversal gibi birçok genin araştırılması gereken durumlarda algoritmalarda yer alabileceği düşünülmektedir. Ayrıca seks reversalin araştırılmasında, hastalıktan sorumlu olduğu bilinen genlerde mutasyon bulunmayan hastalarda, Array sistemlerinin kullanılmasının da yeni gen/genler bulunmasında fayda sağlayacağı düşüncesi bu çalışma ile desteklenmiştir.

7. KAYNAKLAR

- 1- Sizonenko PC, Human sexual differentiation [http://www. gfmer.ch/Books/Reproductive health/Human sexual differentiation](http://www.gfmer.ch/Books/Reproductive%20health/Human_sexual_differentiation)
- 2- Langman's Medical Embriology 11th Edition, Sadler T.W., 2009.
- 3- Chung YP, Hwa HL, Tseng LH, Shyu MK, Lee CN, Shih J, et al. Prenatal Diagnosis of 10q25 associated with single umbilical artery and sex reversal: Report of a case. Prenatal Diagnosis 1998;18(1):73-77.
- 4- Ostrer H. Disorders of Sex Development (DSDs): An Update. JCEM 2014, 99 (5), DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2013-3690>
- 5- Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. Nature 1959;(183):302-303.
- 6- Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). Lancet 1959;(1)711-713.
- 7- Lorda-Sanchez I, Petersen MB, Binkert F, Maechler M, Schmid W, Adelsberger PA, et al. 48,XXY,+21 Down syndrome patient with additional paternal X and maternal 21. Hum Genet. 1991;87(1):54-56
- 8- Sekido R, Lovell-Badge R, Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge. Trends Genet. 2009 Jan;25(1):19-29
- 9- McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M, A Regulatory Cascade Hypothesis for Mammalian Sex Determination: SRY Represses a

- Negative Regulator of Male Development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 15;90(8):3368-3372.
- 10- Kellermayer R, Halvax L, Czako M, Shahid M, Dhillon VS, Husain SA, et al., A novel frame shift mutation in the HMG box of the *SRY* gene in a patient with complete 46,XY pure gonadal dysgenesis. *Diagn Mol Pathol*. 2005 Sep;14(3):159-63
 - 11- Fleming A, Vilain E, Endless quest for sex determination genes. *Clin Genet*. 2005 Jan;67(1):15-25
 - 12- Kashimada K, Koopman P, *SRY*: the master switch in mammalian sex determination. *Development*. 2010 Dec;137(23):3921-30 doi:10.1242/dev.048983 2010
 - 13- Elektronik veritabanı: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php> (Mart 2014)
 - 14- Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, and Bartley J. Autosomal XX Sex Reversal Caused by Duplication of *SOX9*. *Am J Med Genet*. 1999 Dec 3;87(4):349-53.
 - 15- Barbaro M, Oscarson M, Schoumans J, Staaf J, Ivarsson SA, and Wedell A. Isolated 46,XY Gonadal Dysgenesis in Two Sisters Caused by a Xp21.2 Interstitial Duplication Containing the *DAX1* Gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Aug;92(8):3305-13

- 16- Lin L, Philibert P, Ferraz-de-Souza B, Kelberman D, Homfray T, Albanase A, et al. Heterozygous Missense Mutations in Steroidogenic Factor 1 (*SF1/Ad4BP, NR5A1*) Are Associated with 46,XY Disorders of Sex Development with Normal Adrenal Function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Mar;92(3):991-9.
- 17- Lin L, Gu W-X, Ozisik G, To WS, Owen CJ, Jameson L, et al. Analysis of *DAX1 (NR0B1)* and Steroidogenic Factor-1 (*NR5A1*) in Children and Adults with Primary Adrenal Failure: Ten Years' Experience. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Aug;91(8):3048-54. Epub 2006 May 9.
- 18- Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, De'lot E, Chen X, Dewing P, et al. Up-Regulation of WNT-4 Signaling and Dosage-Sensitive Sex Reversal in Humans. *Am J Hum Genet.* 2001 May;68(5):1102-9.
- 19- Philibert P, Biason-Lauber A, Rouzier R, Pienkowski C, Paris F, Konrad D, et al. Identification and Functional Analysis of a New *WNT4* Gene Mutation among 28 Adolescent Girls with Primary Amenorrhea and Müllerian Duct Abnormalities: A French Collaborative Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Mar;93(3):895-900.
- 20- Clement-Ziza M, Khen N, Gonzales J, Cretolle-Vastel C, Picard J, Tullio-Pelet A, et al. Exclusion of *WNT4* as a major gene in Rokitansky-Küster-Hauser anomaly. *Am J Med Genet A.* 2005 Aug 15;137(1):98-99.
- 21- Little M, and Wells C. A Clinical Overview of *WT1* Gene Mutations. *Hum Mutat.* 1997;9(3):209-25.

- 22- Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene *WT1*(alternative splicing/genomic structure). Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Nov 1;88(21):9618-22.
- 23- Hersmus R, Zwan YG, Stoop H, Bernard P, Sreenivasan R, JW, Brüggewirth et al. A 46,XY female DSD patient with bilateral gonadoblastoma, a novel SRY missense mutation combined with a WT1 KTS splice-site mutation. PLoS One. 2012;7(7):e40858. doi: 10.1371/journal.pone.0040858.
- 24- Bradford ST, Wilhelm D, Bandiera R, Vidal V, Schedl A, Koopman P. A cell-autonomous role for *Wt1* in regulating *Sry* in vivo. Hum Mol Genet. 2009 Sep 15;18(18):3429-38.
- 25- Kim J, Prawitt D, Bardeesy N, Torban E, Vicaner C, Goodyer P, et al., The Wilms' Tumor Suppressor Gene (*Wt1*) Product Regulates Dax-1 Gene Expression during Gonadal Differentiation, Mol Cell Biol. 1999 Mar;19(3):2289-99.
- 26- Cardoso C, Timsit S, Villard L, Khrestchatisky M, Fontès M, Colleaux L. Specific interaction between the XNP/ATR-X gene product and the SET domain of the human EZH2 protein. Hum Mol Genet. 1998 Apr;7(4):679-84.
- 27- Villard L, Toutain A, Lossi AM, Gecz J, Houdayer C, Moraine C, et al., Splicing Mutation in the ATR-X Gene Can Lead to a Dysmorphic Mental Retardation Phenotype without α -Thalassemia. Am J Hum Genet. 1996 Mar;58(3):499-505.

- 28- Tang P, Park DJ, Marshall Graves JA, Harley VR. *ATRX* and sex differentiation. Trends Endocrinol Metab. 2004 Sep;15(7):339-44
- 29- Wada T. X-linked alpha-thalassemia/mental retardation syndrome. Rinsho Byori. 2009 Apr;57(4):382-90
- 30- Katoh-Fukui Y, Miyabayashi K, Komatsu T, Owaki A, Baba T, Shima Y, et al. *Cbx2*, a Polycomb Group Gene, Is Required for *Sry* Gene Expression in Mice. Endocrinology. 2012 Feb;153(2):913-24.
- 31- Biason-Lauber A, Konrad D, Meyer M, DeBeaufort C, Schoenle EJ. Ovaries and female phenotype in a girl with 46,XY karyotype and mutations in the *CBX2* gene. Am J Hum Genet. 2009 May;84(5):658-63
- 32- Lutfalla G, Crollius HR, Brunet FG, Laudet V, Robinson-Rechavi M. Inventing a Sex-Specific Gene: A Conserved Role of *Dmrt1* in Teleost Fishes Plus a Recent Duplication in the Medaka *Oryzias latipes* Resulted in DMY. J Mol Evol. 2003;57 Suppl 1:S148-53.
- 33- Ying M, Chen B, Tian Y, Hou Y, Li Q, Shang X, et al. Nuclear import of human sexual regulator DMRT1 is mediated by importin-beta. Biochim Biophys Acta. 2007 Jun;1773(6):804-13.
- 34- Elektronik veritabanı: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> (Mart 2014).
- 35- Harris SE, Chand AL, Winship IM, Gersak K, Aittomäki K, Shelling AN. Identification of novel mutations in *FOXL2* associated with premature ovarian failure. Mol Hum Reprod. 2002 Aug;8(8):729-33.
- 36- Govoroun MS, Pannetier M, Pailhoux E, Cocquet J, Brillard JP, Couty I. Isolation of chicken homolog of the *Foxl2* gene and comparison of its

- expression patterns with those of aromatase during ovarian development. Dev Dyn. 2004 Dec;231(4):859-70.
- 37- Tran S, Zhou X, Lafleur C, Calderon MJ, Buffy BS, Kimmins S. Impaired Fertility and FSH Synthesis in Gonadotrope-Specific *Foxl2* Knockout Mice. Mol Endocrinol. 2013 Mar;27(3):407-21. doi: 10.1210/me.2012-1286.
- 38- Oxford Desk Reference Clinical Genetics, Firth HV, Hurst JA, Oxford University Press, July 2005, ISBN 0-19-262896-8.
- 39- Berenice BM, Elaine MFC, Alicia B, Marco AR, Sorahia D. 46,XY DSD due to impaired androgen production. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2010 Apr;24(2):243-62. doi: 10.1016/j.beem.2009.11.003.
- 40- Chen SY, Lin SJ, Tsai LP, Chou YY. Sex-reversed Acampomelic Campomelic Dysplasia With a Homozygous Deletion Mutation in *SOX9* Gene. Urology. 2012 Apr;79(4):908-11. doi: 10.1016/j.urology.2011.07.1402.
- 41- Bernard VF, Kelly LT, Julia L, Catherine AL, Mohammed S. WAGR Syndrome: A Clinical Review of 54 Cases. Pediatrics. 2005 Oct;116(4):984-8.
- 42- Cedric LC, Capucine D, Joris RV, Michelle B, Madeleine J, Francoise L, et al. Complete sex reversal in a WAGR syndrome patient. Am J Med Genet A. 2007 Nov 15;143A(22):2692-5
- 43- Elektronik veri tabanı: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/docs/rsattributes.html#gmaf> (Şubat 2014)

- 44- Swyer GI. Male Pseudohermaphroditism: A hitherto undescribed form. Br Med J. 1955 Sep 17;2(4941):709-12.
- 45- Elektronik veritabanı: <http://www.affymetrix.com-usersmanual> (Şubat 2014)
- 46- Elektronik veritabanı: <http://decipher.sanger.ac.uk>. (Şubat 2014)
- 47- Elektronik veritabanı: <http://www.ensembl.org>. (Şubat 2014)
- 48- Elektronik veritabanı: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Şubat 2014)
- 49- Elektronik veritabanı: <http://www.genecards.org/> (Mart 2014)
- 50- Elektronik veritabanı: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home> (Mart 2014)
- 51- Page DJ, Mosher R, Simpson EM, Fisher EMC, Mardon G, Pollack J, et al. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. Br Med J. 1955 Sep 17;2(4941):709-12.
- 52- Sinclair AH, Berta P, Palmer PM, Hawkins JR., Griffiths BL, Smith MJ, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature. 1990 Jul 19;346(6281):240-4.
- 53- Su H, Lau YC. Identification of the Transcriptional Unit, Structural Organization, and Promoter Sequence of the Human Sex-determining Region Y (*SRY*) Gene, Using a Reverse Genetic Approach. Am J Hum Genet. 1993 Jan;52(1):24-38.
- 54- Hawkins JR, Taylor A, Berta P, Levilliers J, Van der Auwera B, Goodfellow PN. Mutational analysis of *SRY*: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. Hum Genet. 1992 Feb;88(4):471-4.
- 55- Canto P, Galicia N, Söderlund D, Escudero I, Méndez JP. Screening for mutations in the *SRY* gene in patients with mixed gonadal dysgenesis or with

- Turner syndrome and Y mosaicism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004 Jul 15;115(1):55-8.
- 56- Gao F, Maiti S, Alam N, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The Wilms tumor gene, *WT1*, is required for *SOX9* expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 8;103(32):11987-92.
- 57- Köhler B, Schumacher V, l'Allemand D, Royer-Pokora B, Grüters A. Germline Wilms tumor suppressor gene (*WT1*) mutation leading to isolated genital malformation without Wilms tumor or nephropathy. *J Pediatr.* 2001 Mar;138(3):421-4.
- 58- Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, et al. Wilms' Tumor 1 and Dax-1 Modulate the Orphan Nuclear Receptor Sf-1 in Sex-Specific Gene Expression. *Cell.* 1998 May 1;93(3):445-54.
- 59- Nordenskjöld A, Fricke G, Anvret M. Absence of mutations in the *WT1* gene in patients with XY gonadal dysgenesis. *Hum Genet.* 1995 Jul;96(1):102-4.
- 60- Wilkie AOM, Campbell FM, Daubeney P, Grant DB, Daniels RJ, Mullarkey M, et al. Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of 10q: report of 2 cases. *Am J Med Genet.* 1993 Jun 15;46(5):597-600.
- 61- Yatsenko S, Kruer M, Bader P, Corzo D, Schuette J, Keegan C, et al. Identification of critical regions for clinical features of distal 10q deletion

- syndrome. Clin Genet. 2009 Jul;76(1):54-62. doi: 10.1111/j.1399-0004.2008.01115.x
- 62- Quinonez SC, Park JM, Rabah R, Owens KM, Yashar BM, Thomas W, et al. 9p partial monosomy and disorders of sex development: Review and postulation of a pathogenetic mechanism. Am J Med Genet A. 2013 Aug;161A(8):1882-96. doi: 10.1002/ajmg.a.36018.
- 63- Ledig S, Hiort O, Scherer G, Hoffmann M, Wolff G, Morlot S, et al. Array-CGH analysis in patients with syndromic and non-syndromic XY gonadal dysgenesis: evolution of Array-CGH as diagnostic tool and search for new candidate loci. Hum Reprod. 2010 Oct;25(10):2637-46. doi: 10.1093/humrep/deq167.
- 64- Plath K, Talbot D, Hamer KM, Otte AP, Yang TP, Jaenisch R. Developmentally regulated alterations in Polycomb repressive complex 1 proteins on the inactive X chromosome. J Cell Biol. 2004 Dec 20;167(6):1025-35
- 65- Norling A, Hirschberg AL, Iwarsson E, Wedell A, Barbaro M. CBX2 gene analysis in patients with 46,XY and 46,XX gonadal disorders of sex development. Fertil Steril. 2013 Mar 1;99(3):819-826.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.11.016.
- 66- Larson A, Nokoff NJ, Travers S. Disorders of sex development: clinically relevant genes involved in gonadal differentiation. Discover Discov Med. 2012 Nov;14(78):301-9. y Medicine,2012.

- 67- Li M, Zhang Y, Bharadwaj U, Zhai QJ, Ahern CH, Fisher WE, et al. Down-regulation of ZIP4 by RNA Interference Inhibits Pancreatic Cancer Growth and Increases the Survival of Nude Mice with Pancreatic Cancer Xenografts. Clin Cancer Res. 2009 Oct 1;15(19):5993-6001. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0557.
- 68- Lambeth LS, Raymond CS, Roeszler KN, Kuroiwa A, Nakata T, Zarkower D, et al. Over-expression of *Dmrt1* induces the male pathway in embryonic chicken gonads. Dev Biol. 2014 May 15;389(2):160-72. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.02.012.
- 69- Köhler B, Biebermann H, Friedsam V, Gellermann J, Maier RF, et al. Analysis of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in patients 46,XY disorders of sex development. J Clin Endocrinol Metab. 2011 Jul;96(7):E1131-6. doi: 10.1210/jc.2010-2804

8. ÖZET

46,XY seks reversal, etiyolojisinde birçok genetik faktörün rol oynadığı bir hastalıktır. 46,XY seks reversalin en sık nedenleri arasında (%15) *SRY* geninde görülen mutasyonlar tanımlanmakla birlikte; *SF1*, *SOX9*, *WT1*, *WNT4*, *FOXL2*, *ATRX*, *DHH*, *MAP3K1* ve *CBX2* gibi birçok otozomal lokalizasyonlu genin de mutasyonlarında seks reversal ortaya çıkmaktadır. Bu genlerdeki mutasyonlar izole ya da sendromik gonadal disgeneziye neden olmaktadır. Bu çalışmada, izole 46,XY seks reversala neden olduğu bilinen *SRY*, *WT1* ve *CBX2* genine dizi analizi yapılmış ve bu genlerde patojenik değişiklik izlenmemiştir.

Tek gen mutasyonları dışında 9. kromozomun p kolunun ve 10. kromozomun q kolunun terminal bölge delesyonları ile X kromozomunun p21-p22 bölgesinin (*DAX1*) duplikasyonunun da 46,XY seks reversal hastalığı etiyolojisinde bildirilmiş olması nedeniyle, söz konusu genlerde mutasyon bulunmayan hastalara Array (Affymetrix Tüm Genom SNP Array 2.7) analizi yapılmıştır.

Bu çalışmada, daha önce bildirilmiş olan 9. kromozomun p kolu, 10. kromozomun q kolunda delesyon ve X kromozomunun p21-p22 bölgesinde duplikasyon saptanmamakla birlikte birçok kayıp ve kazanç bölgesi tespit edilmiştir. İki olgumuzda, 8. kromozomun q24.3 bölgesinde saptanan duplikasyonun, literatürde gonadal disgenezi olan bir olguda da bildirilmiş olması nedeniyle bu bölgenin seks reversal etiyolojisinde rol oynayabileceği düşünülmüştür. 8. kromozomun q24.3 bölgesinde bulunan ve duplikasyonları veri tabanlarında polimorfik olarak bildirilmeyen, spermatogenez ve hücre

farklılaşmasında rol alan ve gonadlarda eksprese olan *ZFP41* geni başta olmak üzere, *GLI4*, *TOP1MT*, *RHPN1*, *ZC3HC*, *TIGD5*, *PYCRL*, *TSTA3*, *BREA2* ve *PUF60* genleri aday gen olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: 46,XY seks reversal, Array, CBX2

9. SUMMARY

“Researching for Etiological Factors in Patients with 46, XY Female Phenotype”

Disorders of sex development (DSD) involve several conditions ranging in severity from mild genital abnormalities to complete sex reversal, that result from abnormalities during gonadal determination and differentiation. Sex determination and differentiation in humans are processes that involve the interaction of several genes such as *SF1*, *SOX9*, *WT1*, *WNT4*, *DAX1*, *FOXL2*, *ATRX*, *DHH*, *MAP3K1* and *CBX2*. The Sex determining Region on the Y gene (*SRY*) is located on the short arm of the Y-chromosome and is the crucial switch that initiates testis determination and subsequent male development. Mutations in *SRY* gene are responsible for sex reversal in approximately 15% of 46,XY sex reversal (46,XY DSD) cases.

In this study we research mutations for *SRY*, *WT1* and *CBX2* genes with DNA sequence analysis. No pathogenic mutation was detected in these genes. We used the Array (Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 2.7) to analyse copy number variation in 10 individuals with unexplained 46,XY sex reversal. Chromosome 8q24.3 duplication detected in two cases, this region previously reported in a patient with gonadal dysgenesis. So we focused this region and we describe *ZFP41*, *GLI4*, *TOP1MT*, *RHPN1*, *ZC3HC*, *TIGD5*, *PYCRL*, *TSTA3*, *BREA2* and *PUF6* genes as candidate genes, which could have been responsible for sex reversal.

Many genes need to be investigated to revealed to the etiology of 46,XY sex reversal. This study supports that using array systems provides better to have novel gene/genes.

Keywords: 46,XY sex reversal, Array, CBX2

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı : Fatma Nihal

Soyadı : DİLEK

Doğum Tarihi ve Yeri : 13.04.1982, Ankara

Eğitimi: 2010-2014 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD’de Araş.

Gör. Dr.

2000-2006 Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi

1993-2000 Kayseri, Anadolu Lisesi

1988-1993 Çorum, Albayrak İ.Ö. Okulu

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu

Bilimsel kuruluşlar: Tıbbi Genetik Derneği

Tamamlanmış Projeler:

2012-2014 “46,XY Karyotipli Dişi Fenotipli Hastalarda Etiyolojik Faktörlerin Araştırılması”

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi. Araştırmacı

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

- 1) Tuğ E., Dilek NF, Javdiyan S, Burdon KP, Percin EF. A Turkish family with Nance-Horan syndrome due to a novel mutation. Gene 2013

Ulusal bilimsel toplantılarda bildiri kitaplarında basılan sözlü sunumlar:

- 1) Dilek FN, Percin EF. Four cases with Bardett Biedl Syndrome. V. Dysmorphology Days. Taksim, 2011, İstanbul.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

- 1) Dilek FN, Bakır A, Perçin EF. Donohue Sendromlu Bir Olgu. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 20-23 Aralık 2012, Bursa.

11. EKLER



GAZİ ÜNİVERSİTESİ (GİRİŞİMSSEL OLMAYAN) KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU DEĞERLENDİRME FORMU

DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara
TELEFON	0312 202 69 58
FAKS	0312 202 46 73
E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	46, XY karyotipe sahip dişi fenotipli hastalarda etyolojik faktörlerin araştırılması		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.E.Ferda PERÇİN		
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☒	AKADEMİK AMAÇLI ☐	
		İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA ☒	☐ İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSSEL ☒ İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSSEL OLMAYAN 6.Tanımlamaya yönelik olarak genetik materyalde yapılacak araştırmalar(gen tedavisi klinik araştırmaları dışında kalan)	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİL. GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	SIGORTA	☐		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 196	Toplantı tarihi: 09.05.2012
	Üniversitemiz Tıp Fakültesinde Prof.Dr.E.Ferda Perçin'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı başvuru bilgileri verilen, Uzmanlık Tezi olan klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve "bütçesi dışında" uygun olduğuna G.Ü.T.F. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	
	Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesinin son versiyonu, İyi Klinik Uygulamaları (Uluslararası ICH-GCP) kılavuzu ve bununla ilgili 2001/20/EC ve 2005/28/EC sayılı Avrupa Birliği direktifleri, Biyoloji ve Tıbbın uygulanması bakımından İnsan Hakları ve İnsan haysiyetinin korunması sözleşmesi ve İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin onaylanmasının uygun bulunduğu dair kanun (9.12.2003 tarihli 25311 sayılı Resmi Gazete), 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu (06.11.1981 tarihli 17506 sayılı Resmi Gazete), Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
	ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Canan ULUOĞLU					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

Doç.Dr.Arzu BAKIRTAŞ BAŞKAN YRD.	Çocuk Sağ.ve Hast. Çocuk Allerji	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	ASR
Prof.Dr.Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji	G.Ü.T.F Fizyoloji A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	g
Prof.Dr.Fusun BOZKIRLI ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	G.Ü.T.F Anest.ve Rea. A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	te
Prof.Dr.Emin TÜRKÖZ ÜYE	Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti	G.Ü.D.F Restoratif Diş Ted. ve Endodonti A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	SWDAP
Prof.Dr.Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya	G.Ü.E.F (Ecz.Mes.Bil.) Farmasötik Kimya A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Sefer AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı	G.Ü.T.F Halk Sağlığı A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	Sapam
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D	E	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Öznur L.BOYUNAĞA ÜYE	Radyoloji	G.Ü.T.F Radyoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Galip GÜZ ÜYE	İç Hastalıkları Erişkin Nefroloji	G.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	Aylar
Prof.Dr.Metin YILMAZ ÜYE	Kulak-Burun-Boğaz Hast.	Kulak-Burun-Boğaz Hast. A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	Metin Poyraz
Prof.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp Tarihi A.D	K	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	B. Demirel
Huk.Müş.Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Pektörlük Hukuk Müşavirliği	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	A. Gelir
Emine ŞEKER ÜYE	Sivil Temsilci	Sivil Temsilci	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile ilişki
** :Toplantıda Bulunma