T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CİNSİYET GELİŞİM BOZUKLUKLARI İLE İLİŞKİLİ GENLERİN YENİ NESİL DİZİLEME TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI

AGHARZA AGHAYEV

DANIŞMAN
PROF. DR. Z. OYA UYGUNER

İKİNCİ DANIŞMAN
DR. GÜVEN TOKSOY

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2018

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Agharza AGHAYEV tarafından Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER'in danışmanlığında hazırlanan **"Cinsiyet Gelişim Bozuklukları ile İlişkili Genlerin Yeni Nesil Dizileme Tekniği ile Araştırılması"** başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 22.01.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Sehet BAŞARAN
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik A.D.

Prof. Dr. Şükran POYRAZOĞLU
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Çocuk Sağ. ve Hast. A. D.

Prof. Dr. Firdevs BAŞ
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Çocuk Sağ. ve Hast. A. D

Prof. Dr. Tülay GÜRAN
Marmara Ünü. Tıp Fakültesi
Çocuk Sağ. ve Hast. A. D.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

AGHARZA AGHAYEV



İTHAF

Ailem'e...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübesi ile daima yol gösteren, çalışmalarımı yakından takip edip, yardımlarını esirgemeyen, sabırlı ve öğretici, sevgili tez danışman hocam sayın *Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER*'e,

Tezimin her cümlesini büyük bir özveri ve sabır ile okuyarak yol gösteren ve değerli fikirlerini esirgemeyen, kendisinden çok şey öğrendiğim sayın hocam *Prof. Dr. Seher BAŞARAN*'a,

Bilgi ve destekleriyle hep yanımda olan sevgili hocam *Doç. Dr. Birsen KARAMAN*'a,

Özellikle yeni nesil dizileme çalışmalarımda yol gösteren, tezimin her aşamasında yanımda olan, ikinci tez danışmanım ve ağabey olarak gördüğüm sayın *Dr. Güven TOKSOY*'a,

Moleküler genetik bilgilerini her daim zaman ayırarak benimle paylaşan, eğitimim sırasında kendisinden çok şey öğrendiğim ve ağabey olarak gördüğüm sayın *Dr. Çağrı GÜLEÇ*'e,

Tezimdeki özellikle klinik bilgilerin oluşturulmasında öğretici ve yardımcı olan sayın hocalarım *Prof. Dr. Firdevs BAŞ* ve *Prof. Dr. Şükran POYRAZOĞLU*'na, çalışma grubumuzun oluşturulması ve olgu değerlendirilmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen sayın *Uzm. Dr. Umut ALTUNOĞLU, Uzm. Dr. Şahin AVCI* ve *Uzm. Dr. Zehra Yavaş ABALI*'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca moral ve motivasyon desteklerini esirgemeyen, bana destek olan değerli çalışma arkadaşlarım başta *Alev Yalın,Volkan Karaman,Fatih Tepgeç,Havva Öztürk, Ebru Pektaş ve Emel Özvardar* olmak üzere tüm Tıbbi Genetik poliklinik ve laboratuvar çalışanlarına, dosya araştırmaları sırasında yaptığı yardımları için *Kadir Kaya*'ya,

Çalışmalarımda bana destek olan sevgili arkadaşlarım *Adam Najaflı, Somayyeh Heidargholizadeh, Burcu Sevinç* ve *Gülendam Bagirova*'ya,

Eğitimime katkılarından dolayı Azerbaycan Cümhuriyeti Eğitim Bakanlığı'na

Beni bu günlere getiren, eğitimim boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili aileme, üzerimde emeği olan ve yolumun kesiştiği herkese,

En içten teşekkürlerimle,

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2017-24211

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİİ
ÖZET XV
ABSTRACT ..... XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Genital Sistemin Embriyogenezi, Cinsiyet Farklılaşması ve Genetik Kontrolü 4
2.1.1. Erkek Cinsiyet Farklılaşması ve Genetik Kontrolü 9
2.1.2. Dişi Cinsiyet Farklılaşması ve Genetik Kontrolü 11
2.1.3. Cinsiyet Farklılaşmasında Rol Alan Genler 15
2.2. Cinsiyet Gelişim Bozuklukları (CGB) 18
2.2.1. Cinsiyet Kromozom Anomalilerine Bağlı CGB 20
2.2.1.1. 47, XXY (Klinefelter sendromu ve varyantları) 20
2.2.1.2. 45, X (Turner sendromu ve varyantları) 21
2.2.1.3. Miks Gonadal Disgenezi (MGD) 21
2.2.2. 46,XY CGB 22
2.2.2.1. Gonadal Disgenezilerin Neden Olduğu 46,XY CGB 22
2.2.2.2. Testiküler Regresyon Sendromu 23
2.2.3. Androjen Sentez Kusurlarına Bağlı 46,XY CGB 23
2.2.3.1. Hatalı Leydig Hücre Farklılaşması, LH Reseptör Bozukluğuna Bağlı 46,XY CGB 23
2.2.3.2. Kolesterol Sentez Bozukluklarına Bağlı 46,XY CGB. Smith-Lemli-Opitz Sendromu ve Diğerleri 24
2.2.3.3. Adrenal ve Testiküler Steroidogenez Enzim Kusurlarına Bağlı 46,XY CGB 24

2.2.3.4. Elektron Transferinin Bozulması Sonucu Etkilenmiş Steroidogeneze Bağlı 46,XY CGB....26
2.2.3.5. Testosteron Metabolizması Bozukluğuna Bağlı 46,XY CGB. Steroid 5-α Redüktaz Enzim Eksikliği....27
2.2.3.6. Androjen İşlevindeki Bozukluklara Bağlı 46,XY CGB. Androjen Duyarsızlık Sendromları....28
2.2.3.7. Diğer Nedenler....30
2.2.4. 46,XX CGB....30
2.2.4.1. Gonadal Disgenezilerin Neden Olduğu 46,XX CGB....30
2.2.4.2. Androjen Sentez Bozukluklarına bağlı 46,XX CGB. Konjenital Adrenal Hiperplazi....31
2.2.5. CGB'de Klinik Tanı....33
2.2.5.1. CGB'lerde Genital Yapı Skorlamaları....35
2.3. Moleküler Yöntemler....37
2.3.1. DNA Dizileme Yöntemleri....37
2.3.1.1. Sanger Dizileme....38
2.3.1.2. Yeni Nesil Dizileme....39
2.3.2. MLPA (Multiple Ligation - dependent Probe Amplification)....45
3. GEREÇ VE YÖNTEM....48
3.1. Çalışma Grubu....48
3.2. Yöntemler....48
3.2.1. Klinik Değerlendirmeler....48
3.2.2. Moleküler Yöntemler....48
3.2.2.1. DNA Eldesi....48
3.2.2.2. DNA Kalite Değerlendirme, Seyreltme ve DNA Yoğunluğunun Ölçümü....49
3.2.2.3. Yeni Nesil Dizileme Tabanlı Panel-Gen Testi....49
Yeni nesil dizileme tabanlı panel gen çalışması Ion Torrent PGM platformunda yapıldı....49
Hedef Genlerin Belirlenmesi....49
Primer Havuzlarının Oluşturulması....50
Hedef Bölgelere Ait *Hotspot* Dosyasının Oluşturulması....52
Kütüphane Hazırlanması....53
Barkodlanan Kütüphane Ürünlerinin Saflaştırılması....56

Saflaştırılmış Kütüphane Ürünlerinin Normalizasyonu, Ölçümü ve Sulandırma Faktörünü Hesaplama.....56
Taslak (Template) Hazırlanması.....58
Zenginleştirilmiş Ürünlerin Dizilenmesi.....61
Veri Analizi.....63
3.2.2.4. YND ile Saptanan Değişimlerin ve Panel-Gen Testi ile Kapsanmayan veya Düşük Okuma Alınan Bölgelerin Sanger DizilemeÇalışmaları.....64
3.2.2.5. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) Analizi 68
3.2.3. *Ion Torrent* Platformunda CNV Analizi 71
3.2.4. Proteinin Üç Boyutlu Yapısının Modellenmesi 72
4. BULGULAR.....73
4.1. YND Teknik Sonuçlarına Genel Bakış.....73
4.2. Olgu Sonuçları 73
4.2.1. 46,XY CGB'li Olguların Fizik Muayene, Hormonal Bulguları ve Genetik Analiz Sonuçları.....74
4.2.1.1. Gonadal Gelişim Kusurları 74
4.2.1.2. Androjen Sentez Bozuklukları 86
4.2.1.3. İzole Kriptorşidizm, Hipospadias.....103
4.2.2. Sanger Dizileme Tekniği ile Doğrulanamayan ve Aile İçi Segregasyon Analizi İle Tesadüfi Olarak Değerlendirilen YND Sonuçları 105
5. TARTIŞMA 110
KAYNAKLAR 127
HAM VERİLER 146
FORMLAR 147
ETİK KURUL KARARI 156
PATENT HAKKI İZNİ 159
İNTİHAL RAPORU 160
ÖZGEÇMİŞ 161

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Primordial gonad gelişiminde rol oynayan genler ve işlevleri (12,13,16)…...8
Tablo 2-2. Cinsiyet farklılaşmasında rolü olan genlerin sınıflandırılması ve fonksiyonel yansımaları……...15
Tablo 2-3. CGB'nin karyotip temelli sınıflandırılması (4).....18
Tablo 2-4. ADS'lerin sınıflandırılması (113)……...28
Tablo 2-5. KAH'a neden olan enzim eksiklikleri (137)……...31
Tablo 2-6. Dizileme platformlarının karşılaştırılması *(172)'den alınmış ve yeniden düzenlenmiştir*…….....40
Tablo 2-7. Yeni Nesil Dizleme uygulamalarının karşılaştırılması *(185)'den alınmış ve yeniden düzenlenmiştir*……41
Tablo 2-8. *In silico* analiz yazılımları……..44
Tablo 3-1. Panel-gen testinde yer alan genler, ilişkili olduğu hastalıklar ve kapsam oranları……49
Tablo 3-2. Primer havuzu (2x) için hazırlanan karışım……...52
Tablo 3-3. Kütüphane PZR için hazırlanan karışım……53
Tablo 3-4. Hedef bölge amplifikasyonunda kullanılan termal döngü programı…….53
Tablo 3-5. Primer dizilerinin kesimi için kullanılan termal döngü programı…….53
Tablo 3-6. Barköd-adaptör karışımı……54
Tablo 3-7. Barkod-adaptör ligasyon karışımı ve termal döngü programı……...54
Tablo 3-8. Kütüphane amplifikasyonu için termal döngü programı……...56
Tablo 3-9. Kütüphane seyreltilmesi…….58
Tablo 3-10. emPZR çözeltisi……...58
Tablo 3-11. Zenginleştirme aşamasında 8 kuyulu levhanın doldurulması……..60
Tablo 3-12. Dizileme planı……..61
Tablo 4-1.YND çalışmalarının Torrent Server ve Ion Reporter arayüzlerinden elde edilen metrik sonuçları……72
Tablo 4-2. 46,XY Gonadal gelişim bozukluğu olan olguların başvuru yaşındaki fizik muayene, hormonal ve görüntüleme bulguları……77
Tablo 4-3. 46,XY Gonadal gelişim bozukluğu olan olguların genetik analiz sonuçları……..79

Tablo 4-4. 46,XY Androjen sentez bozukluğu olan olguların başvuru yaşındaki fizik muayene, hormonal ve görüntüleme bulguları……87
Tablo 4-5. 46,XY Androjen sentez bozukluğu olan olguların genetik analiz sonuçları……...89
Tablo 4-6. 46,XY izole kriptorşidizm/hipospadias olan olgunun a) başvuru yaşındaki fizik muayene, hormonal ve görüntüleme bulguları b) genetik analiz sonucu……..103
Tablo 4-7. YND İle Mutasyon Saptanmayan Olgular……...107

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. Embriyonun tranvers kesitinde ara (intermediyer) mezodermin görüntüsü (11). 4
Şekil 2-2.Primordial germ hücrelerinin göçü (16). 5
Şekil 2-3. Beş haftalık embriyoda bipotansiyel gonadın testis veya over olarak farklılaşması (11). 7
Şekil 2-4. Cinsiyet farklılaşması aşamalarının şematik gösterimi. 14
Şekil 2-5. ADS'lerde dış genital evreleme. 35
Şekil 2-6. Prader evrelemesi. 36
Şekil 2-7. Sanger Dizileme'nin aşamaları. 39
Şekil 2-8. Ion Torrent platformunda sinyal işleme ve baz isimlendirme. 44
Şekil 2-9. MLPA tekniğinin basamakları ve reaksiyonda kullanılan probun özellikleri. 46
Şekil 3-1. *Ion OneTouch 2* cihazında emülsiyon PZR. 59
Şekil 3-2. *Ion OneTouch™ ES* cihazında zenginleştirme aşaması... 59
Şekil 4-1. *NR5A1* geninde saptanan mutasyonların protein üzerindeki (Q13285, NP_004950) yeri. 85
Şekil 4-2. a)Yabanıl form proteinin FMN domeinindeki alfa-heliks (*p*P399-*p*M408) yapısının üç boyutlu yapısı b) Mutant proteinin (p.Pro399_Gln401dup) FMN domenindeki alfa heliksin üç boyutlu yapısı 97
Şekil 4-3. Proteinin üst kısımda yabanıl ve alt kısımda mutant formlarının ikincil yapılarının analizi. (H: heliks, S: iplik, C: bobin sarmal yapı) 97
Şekil 4-4. Proteinin a) yabanıl ve b) mutant formlarının çözünürlüklerinin karşılaştırılması. (0 skoru membrana gömülü (hidrofobik) aminoasitleri, 9 skoru ise serbest (hidrofilik) olanları göstermektedir) 98
Şekil 4-5. Proteinin a) yabanıl ve b) mutant formlarının termal devinim açısından karşılaştırılması. 98
Şekil 4-6. Proteinin FAD domeninde alfa heliksin başlangıç ve bitiş aminoasitlerinin *p*P399 ve *p*M408 aminoasitlerinin Cα atomları ile FAD domeininin kararlı üç boyutlu yapısının oluşumunda önemli olduğu bilinen *p*C437, *p*P438 ve *p*S439 aminoasitlerinin Cα atomları arasındaki mesafenin yabanıl ve mutant proteinde ölçümü (Å). 99

Şekil 4-7. a) *Ion Reporter* CNV analizi sonucunun IGV görünümü, b) Doğrulama çalışması, gerçek zamanlı PZR çalışması ΔΔCT analiz görünümü (Olgu 25). 199

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

aCGH : Array Comparative Genomic Hybridization

AMH : Anti-Mülleriyen hormon

ADS : Androjen Duyarsızlık Sendromu

bç : Baz çifti

BAM : Binary Alignment Map

CNV : Copy Number Variation

cDNA : Complementary DNA (tamamlayıcı DNA)

DSD (CGB) : Disorders of Sexual Development (Cinsiyet Gelişim Bozuklukları)

DNA : Deoksiribonükleik asit

dH_2O : Distile su

dNTP : Deoksiribonükleotid trifosfat

ddNTP : dideoksinükleotid

dk : dakika

EDTA : Etilendiamin tetraasedik asit

ExAC : Exome Aggregation Consortium

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

HGMD : Human Gene Mutation Database (İnsan Mutasyon Veri Bankası)

IGV : Integrative Genomics Viewer

ISP : Ion Sphere Particles

KAH : Konjenital Adrenal Hiperplazi

MLPA : Multiple Ligation Dependent Probe Amplification

NCBI : The National Center for Biotechnology Information

O.D. : Optik dansite

OD : Otozomal Dominant

OR : Otozomal Resesif

OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man

PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PGH : Primitif Germ Hücreleri

SD : Sanger Dizileme

Sn : saniye

Tm : Temperature of Melting (Erime ısısı)

TSS : Torrent Suit Server

TED : Tüm Ekzom Dizleme

TGD : Tüm Genom Dizileme

TDF : Testis Determining Factor

USCS : University of California Santa Cruz

UTR : Untranslated region

USG : Ultrasonagrafi

VCF : Variant Call Format

YND : Yeni Nesil Dizleme

µl : mikrolitre

ÖZET

Aghayev A.R. Cinsiyet Gelişim Bozuklukları İle İlişkili Genlerin Yeni Nesil Dizileme Tekniği İle Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2018.

Cinsiyet gelişim bozuklukları (CGB) tek gen veya kromozom anomalilerine bağlı olarak gonadal ve anatomik cinsiyetin uyumsuz olarak geliştiği konjenital durumları tanımlamakta olup, hafif hipospadiastan gonad gelişim anomalilerine bağlı tam cinsiyet dönüşümüne kadar geniş spektrumda gözlenir ve insidansı 1/5500'dir. CGB gonadal gelişim bozukluğunda, androjen sentezi veya etkisindeki kusurlardan, çevresel faktörlerin de içinde yer aldığı birçok etmenin rolü olduğu bildirilmektedir. CGB'ler yenidoğanın acil sorunları arasında olup, erken tanı, yaşam kalitesi, ruhsal durum ve genetik danışma açısından önem taşımaktadır. Kuşkulu dış genital yapı ile doğan bebeklerde cinsel kimliğin belirlenmesinde dış genital görünümün yanı sıra kromozomal cinsiyet, gonadların over veya testis yönünde farklılaşmış olması, iç genital yapı ve hormonların etkisinin araştırılması önemlidir. CGB'nin klinik ve genetik heterojenliği, kesin tanı için sorumlu genlerin eş zamanlı ve kısa sürede dizilenmesini, delesyon/duplikasyon analizlerinin yapılmasını gerektirmektedir. Bu çalışmada, klinik tanısında CGB düşünülen, kromozomal cinsiyeti belirlenmiş ve kromozom anomalileri dışlanmış, MLPA analizinde herhangi bir delesyon/duplikasyon saptanmamış 44 olguda, ilişkili 31 genin tüm kodlayan ekzon, ekzon-intron sınır bölgelerini kapsayan, ekibimizce tasarlanmış panel-gen testi ile Ion Torrent platformunda yapılan incelemeden elde edilen varyantlar değerlendirildi. Klinik önemi belirlenen değişimler özgün primerler tasarlanarak Sanger dizi ile doğrulandı, olanaklı olan ailelerde segregasyon analiz sonuçları irdelendi, herhangi bir mutasyon/varyant ilişkisi saptanmayanlarda panelin tasarım gereği kapsam dışı bıraktığı bölgeler Sanger dizileme ile incelendi. 17 olguda 8 farklı gende (*HSD17B3, DHH, NR5A1, LHCGR, WT1, POR, ZFPM2* ve *HOXA4*) altısı daha önce tanımlanmış ve 13'ü literatürde bildirilmemiş olası ilişkili varyantlar saptandı ve tanı oranı % 38,6 olarak belirlendi. Ayrıca serimizdeki tüm örneklerde, YND platformunda biyoinformatik istatistiksel hesaplamaya dayalı kopya sayı varyant (KSV) analiz program kullanılarak büyük delesyon ve duplikasyonlar dışlandı. Kodlayan bölgede yeni mutasyon saptanan bir örnek için üç boyutlu modelleme ile protein yapısında oluşturması beklenen yapısal farklılıklar simülasyon programları yardımıyla incelendi. Bildiğimiz kadarıyla ülkemiz için ilk tasarlanmış panel uygulaması olan çalışmamız sonuçlarının, toplumumuzda CGB ilişkili genlerin ve mutasyon frekanslarının saptanmasına, gonadal tümörler açısından erken dönemden itibaren takip olanağının sağlanmasına, taşıyıcı bireylerin belirlenerek aile planlamasına yardımcı olmasına katkı sağlaması beklendi.

Anahtar Kelimeler : Cinsiyet Gelişim Bozuklukları, Yeni Nesil Dizleme, *Ion Torrent* Platformu, MLPA, *POR*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2017-24211

ABSTRACT

Aghayev A.R.Evaluation of Disorders of Sexual Development Associated Genes by Next Generation Sequencing Technology. Istanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department. Master Thesis in Genetics. Istanbul. 2018

Disorders of sexual development (DSD) are defined as congenital conditions covering a wide spectrum of clinical expressions from mild hypospadias to gonad abnormalities causing complete sex reversal. The incidence of DSD is one in approximately 5,500 births. It occurs when the development of the chromosomal and anatomical sex is incompatible with the assigned gender. This can be the result of a single gene mutation or chromosomal abnormality, gonadal development anomalies or defects occurring within androgen biosynthesis. Environmental factors are also known to be among the causative components of DSD.Early diagnosis is vital as it will impact the individual's mental well-being and overall life quality, including the advisability for genetic counseling. In the gender assignment of newborns with ambiguous genitalia, it is important to consider the effect of hormones, chromosomal sex, and the presence of testis or ovary, the phase of external genitalia along with the rearing of the child. The clinical and genetic heterogeneity of DSD requires rapid, accurate parallel sequencing, as well as copy number changes of associated genes to determine its proper diagnosis. In this study, we evaluated the results of 44 DSD cases for gross deletion/duplication with MLPA and for sequence alteration with in-house-designed next generation sequencing (NGS) targeted gene panel, using an Ion Torrent platform, covering all exon and exon-intron boundaries of 31 DSD associated genes. Chromosomal sex in each of the cases was previously revealed and structural chromosomal abnormalities excluded before the admission of molecular genetic analysis. Screening of targeted regions that were missed by AmliSeq primer design is covered by Sanger sequencing. Segregation analysis was performed only for consented family members for novel missense alterations suspected to be causative. According to our results, six previously described and 13 possible DSD associated rare variants not associated with this phenotype, was identified in eight different genes (*HSD17B3, DHH, NR5A1, LHCGR, WT1, POR, ZFPM2* and *HOXA4*), within a total of 17 cases, a diagnostic rate of 38.6 percent. Gross deletions and duplications were excluded in all samples in our cohort using the bioinformatic statistical calculation for copy number variant (CNV) in Ion Reporter copy number analysis program. The structural alteration in one novel coding region was simulated in three dimensional in silico protein modeling program. Our technical approach, which a literature search shows to be the first of its kind conducted in Turkey, provides new research data for DSD mutation frequencies occurring in the country. It further underscores the critical role of early diagnosis, and in cases of gonadal tumors, expedient treatment. Individuals identified as DSD carriers are advised to receive genetic counseling for family planning.

Key Words: Disorders of Sexual Development, Next Generation Sequencing, *Ion Torrent*, MLPA, *POR*

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TYL-2017-24211

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Cinsiyet kromozomal olarak (XX veya XY) zigot aşamasında belirlenir ve bu da daha sonraki aşamalarda gonad gelişimini ve anatomik yapının oluşumunu etkiler. Bu gelişim sürecinde onlarca gen rol almaktadır. Bu süreç, 1) bipotansiyel gonadın gelişimi, 2) bipotansiyel gonadların testis veya over yönüne farklılaşması, 3) Wolf kanallarından epididim, vas deferens ve semina vezikülarisin, Müller kanallarından ise uterus, fallop tüpleri ve üst vajen kısmının gelişimi, 4) dış genital yapının penis ve skrotum veya klitoris ve labiayalara farklılaşması aşamalarını içermektedir. Kromozomal ya da tek genlerde oluşan mutasyonların yol açtığı kromozomal cinsiyet ile uyumsuz gonadal ve/veya anatomik gelişim sorunları çok heterojen bir grubu oluşturur ve "Cinsiyet gelişim bozuklukları (CGB, DSD: Disorders of Sexual Development)" olarak tanımlanır. Prevalansı ve insidansı ile ilgili veriler kısıtlı olsa da genel olarak insidansın 1:5500 olduğu bildirilmektedir (1-3).

Gonadal farklılaşmada görevli genlerin kodladığı proteinler uygun gelişim evresinde, uygun dozda ve etkin olarak, engelleyici ve uyarıcı mekanizmalarla denge içinde çalışmalıdır. Gonadal farklılaşmanın herhangi bir basamağındaki bir hata büyük bozukluklara; gonadal disgenezilere yol açabilir (2). Genital fenotipin çok geniş bir spektrumda gözlenmesi ve genotip-fenotip ilişkisinin zayıf olması patolojileri net sınırlar içinde tanımlamayı güçleştirmektedir. CGB'nin klinik sınıflaması yakın zamanlara kadar gonadların over veya testis dokusunu içermesine göre yapılırken, yeni sınıflamada karyotip ön plana çıkmaktadır (4-6). Bu sınıflandırmaya göre CGB olguları üç ana grupta değerlendirilmektedir: cinsiyet kromozom anomalilerine bağlı CGB, 46,XY CGB ve 46,XX CGB.

Fertilizasyon anında genetik cinsiyet belirlenmesine rağmen her iki cinsiyette de embriyonal dönemin başlarında gonadlar bipotansiyel olup, insanlarda konsepsiyondan 5 hafta sonra ürogenital çıkıntıdan primordial gonadlar gelişmeye başlamaktadır. Cinsel gelişim, primordial gonadın testis veya over olarak gelişimine yol açacak olan cinsiyetin belirlenmesi (sex determination) ve testis/overlerden salınan hormonların yardımı ile iç ve dış genital yapının şekillenmesi ile üreme işlevinin kazanılmasını sağlayacak olan cinsel farklılaşma (sex differentiation) olarak bilinen birbirini takip eden iki ayrı basamaktan oluşur (7). Testis gelişiminde anahtar rol oynayan *SRY*'nin

ekspresyonu *WT1*, *SF1*, *GATA4*, *GATA4*'ün kofaktörü olan *ZFPM2* ve *CBX2* tarafından düzenlenirken, XX gonadda over gelişiminde *RSPO1*, *WNT4*, *CTNNB1*, *FOXL2* ve *FST* görev alır (7). Cinsiyet gelişim bozuklukları, otozomal kromozom anomalilerine (Trizomi 13, 18; 4p-; 13q-), asosiasyonlara (VACTERL/VATER, CHARGE, WAGR) ve birçok sendroma (Denys-Drash, Frasier, Kampomelik displazi, Palmoplantar hiperkeratoz, skuamöz hücreli karsinoma ile birlikte XX seks "reversal") eşlik edebilir (8).

CGB'nin klinik ve genetik heterojenliği, kesin tanı için sorumlu genlerin eş zamanlı ve kısa sürede dizilenmesini, delesyon/duplikasyon analizlerinin yapılmasını gerektirmektedir. Güncel yaklaşımda Yeni Nesil Dizileme (YND) teknolojilerinin en ekonomik ve en hassas yaklaşımı sunduğu bildirilmektedir. Moleküler genetik tanıda, YND teknolojisi Sanger dizilemeden farklı olarak çok sayıda gen bölgesinin hızlı taranmasını sağlarken, düşük kapsamda dizilediği veya hiç kapsamadığı bölgeler için hastalık ilişkili mutasyonları gösterememe riski de bulunmaktadır. Amacımız, dizi varyantları için hedef genlerin YND tabanlı panel-gen testleri ile dizilenmesinin, büyük delesyon/duplikasyonlar için MLPA yönteminin kullanılmasının etkinliğini araştırmaktır.

Bu çalışmada, klinik tanısında CGB düşünülen, kromozomal cinsiyeti belirlenmiş ve kromozom anomalileri dışlanmış olgularda; non-sendromik CGB ile ilişkili 31 genin tüm kodlayan ekzon, ekzon-intron sınır bölgelerine özgün tasarlanmış panel-gen testi ile *Ion Torrent* platformunda uygulanan incelemeden elde edilen varyantlar değerlendirildi, çalışma sonrası klinik önemi olduğu düşünülen varyantlar için özgün primerler tasarlanarak Sanger dizi ile doğrulandı, olanaklı olan ailelerde segregasyon analiz sonuçları irdelendi, herhangi bir mutasyon/varyant ilişkisi saptanmayanlarda panelin tasarım gereği kapsam dışı bıraktığı bölgeler özgün tasarlanan primerler kullanılarak Sanger dizileme ile incelendi. Fenotiple ilişkisi bilinen 14 farklı gendeki olası büyük delesyon ve duplikasyonların MLPA yöntemi ile moleküler tanıya katkısı da değerlendirildi, YND platformunda dizileme verileri ile yapılan CNV analizinin etkinliği araştırıldı. Ayrıca yeni kodlayan bölge mutasyonlarının, üç boyutlu modellemelerde protein yapısında oluşturması beklenen yapısal farklılıklar simülasyon programları ile incelendi.

Sonuçlarımızın, ülkemizdeki cinsiyet gelişimi ile ilişkili genlerde mutasyon saptama oranlarının belirlenmesine, moleküler tanıda panel-gen testinin katkısının değerlendirilmesine, hastaların özgün genetik danışma almalarına ve riskli bireylerin erken dönemde tanı almalarına yardımcı olması beklenmektedir. Ayrıca, yeni tanı ve tedavi protokollerinin geliştirlmesi, genotip-fenotip ilişkileri alanında yapılan araştırmalara da yeni açılımlar sağlaması beklenmektedir.

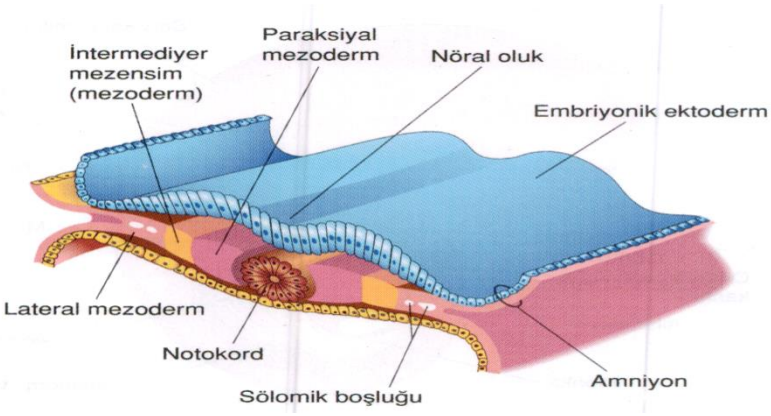
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Genital Sistemin Embriyogenezi, Cinsiyet Farklılaşması ve Genetik Kontrolü

Embriyonun cinsiyeti temelde genetik olarak fertilizasyon anında spermin taşıdığı cinsiyet kromozomu (X veya Y) ile belirlenir, ancak cinsiyete özgü gonadların ve özgün fenotipin oluşması sadece X ve Y kromozomlarında değil otozomal kromozomlarda da lokalize yüzlerce gen ile kontrol edilen evrelerden oluşmakta olup,karyotipi 46,XX veya 46,XY olan embriyoların genital yapısı 7. haftaya kadar fark göstermemektedir.

İnsan embriyosunda üriner ve genital sistemler **ara mezoderm** ve**kloaka'**dan geliştiğinden iki sistem embriyolojik ve anotomik olarak birbirine çok yakındır ve birlikte genitoüriner ya da ürogenital sistem olarak isimlendirilir.

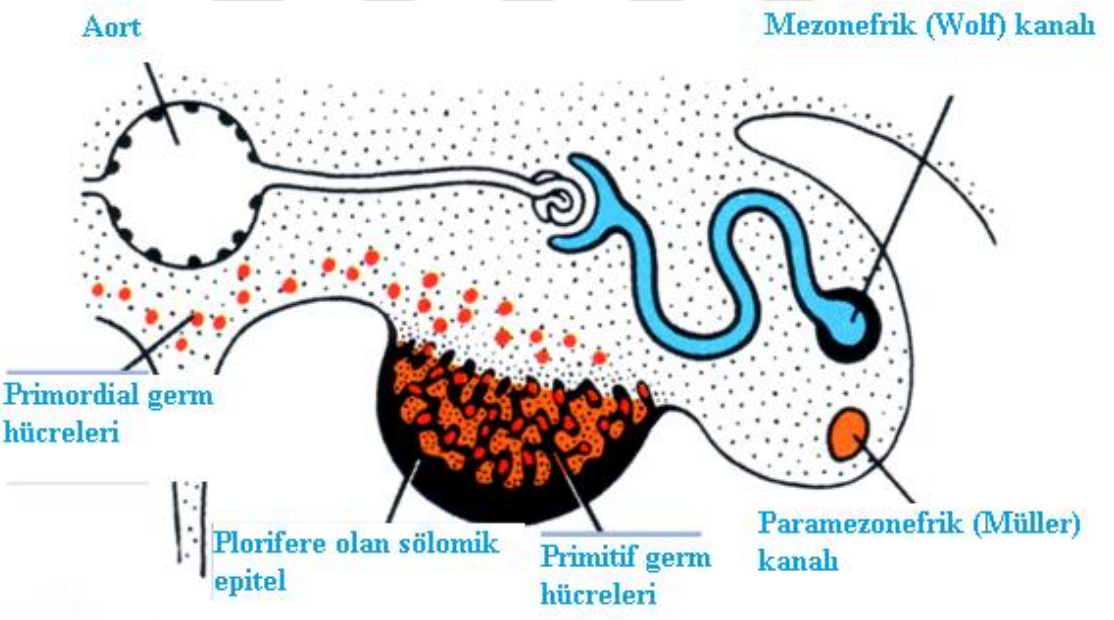
Ürogenital sistemin gelişiminde ilk basamak ara mezodermden primitif gonadın oluşumudur. Primitif gonadlar, notokordun her iki yanında simetrik olarak izlenen, paraksiyel mezoderm ile lateral mezoderm arasında bulunan ara mezodermden gelişir (9,10) (Şekil 2-1). Primitif gonadlar fertilizasyonun 32.gününde gonadal kabartıların sölemik boşluğa bakan yüzeyini kaplayan epitel ve altındaki mezenşimal dokunun ploriferasyonu ile mezonefrozun medialinden gelişmeye başlar (9).



Şekil 2-1. Embriyonun tranvers kesitinde ara (intermediyer) mezodermin görüntüsü (11).

Primitif germ hücreleri pluripotent epiblast hücrelerinden köken alırlar. Fertilizasyonu takip eden ikinci hafta boyunca posterior primitif çizgiye doğru hareket eden öncül hücreler vitellus kesesine göç eder ve dördüncü haftada allantoise yakın bulunan hücreler alkalin fosfataz, c-kit (tirozin kinaz reseptörü), oct-4 ve ektoderm kökenli BMP2, BMP4 ve BMP8 gibi faktörlerin rölü ile primitif germ hücreleri

(PGH)'lere dönüşürler (9,12-15). Embriyonun sefalokaudal ve lateral yönde katlanmasını takiben endodermle kaplı vitellus kesesinin büyük bir kısmı primitif barsağı oluşturmak üzere embriyonun içerisine alınır (16). Fare embriyosunda yapılan çalışmalarla 7.günde PGH'lerin köken aldığı primitif çizginin posterior bölümündeki epiblast hücrelerinde "fragil" geninin anlatımının bu hücrelerin hareketsiz kalmasını ve çoğalmalarını sağladığı, anlatımın azalması ile barsak lümeni içerisinde hareketin başladığı gösterilmiştir. PGH'lerden c-kit ve barsak lümenindeki hücrelerden anlatımı yapılan "steel" ligandı ve bu moleküller arasındaki etkileşim hücrelerin sağkalımını, motilitesini, kolonizasyonunu ve migrasyonunu sağlar (17,18). Barsak lümeni içerisinde hareket eden PGH'lerin epitel ve mezodermi geçerek dorsal mezenter boyunca göç ederek gelişmekte olan genital kabartılara yerleşmesi gerekmektedir. Bu göçün başlangıcında hücrelerin transepitelyal geçişi için *"trapped in endoderm 1"* geni etkindir. Epitel dışına çıkan hücrelerin *Wunen-1* ve *Wunen-2* genlerinin anlatımı ile mezoderme doğru yönlenerek genital kabartılara ulaşımı sağlanır(16) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2.Primordial germ hücrelerinin göçü(16).

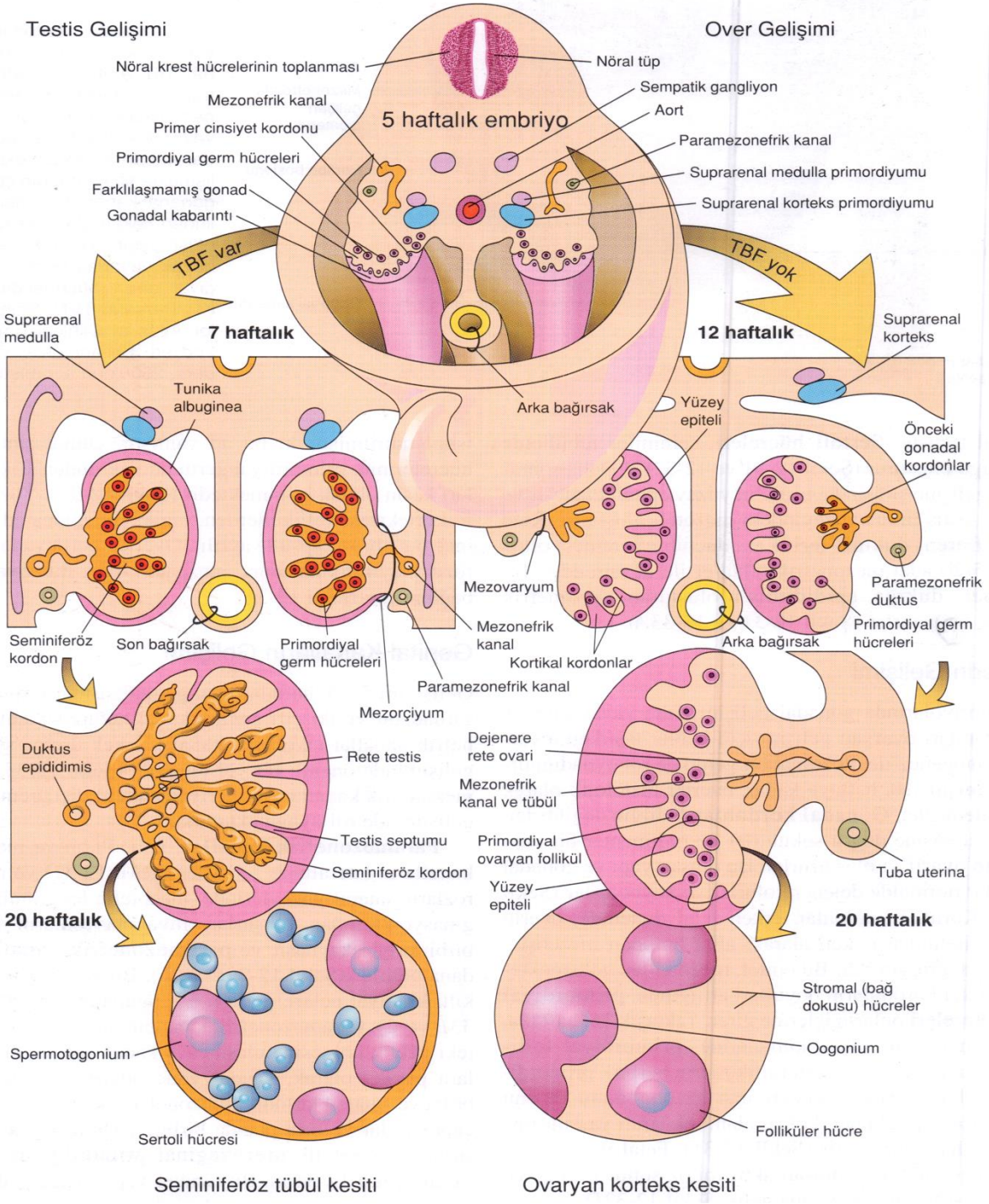
Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar PGH'leri genital kabartılara çeken molekülün stromal kökenli faktör-1 (SdF1) olduğunu göstermiştir. PGH'ler barsaktan teker teker ayrılmalarına rağmen migrasyon süresince etkileşim içerisindedirler ve bu etkileşim hücrelerarası bağlantılarla sağlanmaktadır. Migrasyon boyunca CX43'ün (gap junction proteini) ifade edildiği, germ hücrelerinin genital kabartılara ulaşıp kolonize olduktan sonra ise bu anlatımın azaldığı bildirilmiştir (17). PGH'lerin genital kabartılara

göçü aynı zamanda fibronektin ve laminin gibi ektraselüler matriks proteinlerinin hücre-hücre etkileşimlerine ve anlatım düzeylerine bağlıdır (19). Migrasyon sürecinde GTPaz ve Rho1 proteinlerinin sentezi ve aktin filamentlerinin yardımı ile hücrelerin hareketini sağlayan yalancı ayaklar oluşur (16). Bazı hücreler programlı göç yollarından saparak ekstragonadal alanlara yerleşebilirler, ancakbu hücrelerin bir çoğu dejenere olur, nadir durumlarda mediastinum gibi ektopik alanlarda varlıklarını sürdürürlerse teratom oluşumuna neden olurlar (9).

46,XX veya 46,XY genotipinde olup henüz farklılaşmamış primitif gonadlar tamamen birbirine benzerdir ve bu aşama gonadal gelişimin "**farklılaşmamış gonad veya bipotansiyel gonad evresi**" olarak isimlendirilir (9). Bipontansiyel gonadlar başlangıçta mezodermden köken alan sölemik epitel hücreleri ve ürogenital çıkıntıdaki mezenşimal epitel hücrelerinden oluşan somatik hücreleri yoğun olarak içerir.

XY genotipli embriyoda sölemik epitelden gelen hücreler germ hücrelerini sararak testiküler kordonları oluşturur ve Sertoli hücrelerine farklılaşır. Ayrıca gonad içinde testosteron yapımının gerçekleştiği steroidojenik hücreler olan Leydig hücreleri de gelişir.

XX genotipli embriyoda ise over stroması içinde steroidojenik hücreler olarak teka hücrelerine ve destek hücreleri olan granulosa hücrelerine farklılaşma olur. Teka hücreleri içinde steroid (androstenedion) sentezi başlar ve granulosa hücrelerinde östron/östradiole dönüşür (2,7,10) (Şekil 2-3).



Şekil 2-3. Beş haftalık embriyoda bipotansiyel gonadın testis veya over olarak farklılaşması (11).

Ürogenital çıkıntının ve bipotansiyel gonadların gelişiminde çeşitli transkripsiyon faktörleri rol alır: *LHX1* (LIM homeobox gen 1), *LHX9, EMX2, PAX2, CBX2, ATRX, IR* (insülin reseptör), *IGFR1* (insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1), *WT1* (Wilms tümör baskılayıcı geni), *SF1* (Steroidojenik faktör 1), *GATA 4* ve

WNT4. Transkripsiyon faktörleri direkt ya da sinyal yolaklarını aktive veya inaktive ederek gonadların gelişiminde rol oynar (Tablo 2-1) (2,20,21).

Tablo 2-1. Primordial gonad gelişiminde rol oynayan genler ve işlevleri (12,13,16)

Gen	Lokus	Protein	Protein tipi	Etkileştiği genler	İşlevi	Genin fonksiyonel analizi
EMX2	10p26.1	EMX2	Transkripsiyon faktörü	*WNT4,LH1,HOXA10*	WT1'in antagonisti	***EMX2*-/- fare:** böbrekler, üreterler ve genital kanalların yokluğu ve beyin gelişim kusurları
LHX9	1p31-q32	LHX9	Transkripsiyon faktörü	SF1 anlatımını uyarma	Gonad kordonlarının gelişimini	***LHX9*-/- fare:** gonadal agenezi
SF1 ***NR5A1*** ***FTZF1*** ***Ad4BP***	9q33	SF1	Orfan nükleer reseptör / çinko parmak transkripsiyon faktörü	*WT1(sinerjistik etki), SRY, SOX9, DAX1(antagonist etki), GNRHE, LHb, ACTHR, AMH, AMHR, STAR, CYP11A1, CYP21A2, CYP11B1, OTX vb*	Gonad, adrenal bezlerin gelişimi, steroidojenezi düzenleme	***SF1*-/- fare:** adrenal bezler ve gonadların gelişmemesi, Müllerian persistans, hipotalamus anormalliği
WT1	11p13	WT1	Çinko parmak transkripsiyon faktörü	*DAX1, AMH, SRY, IGF21, IGFR1, PAX2*	*SRY* anlatımını uyarma	
GATA4	8p23.1-p22	GATA4	Çinko parmak transkripsiyon faktörü	steroidojenik enzimleri kodlayan genler	*FOG2*ile etkileşerek gonadal gelişimi dezünleme	***GATA4*-/- fare:** embriyonik dönemde öldürücü gonadal fenotip bildirilmemiştir.
CBX2	17q25.3	CBX2	Transkripsiyon inhibitörü	*SRY*	Kromatin yapısındaki değişiklikler	***CBX2*-/- fare:** gonadal yarık gelişiminde gerilik, XY farede dişi fenotip
WNT4	1p36.23-p35.1	WNT4	Sisteinden zengin sinyal molekülü		Müllerian kanallar ve over gelişimi	***WNT4*-/- fare:** Müllerian agenezi
KIT	4q11-q12	KIT	Transmembran tirozin kinaz reseptörü, protoonkogen		Apoptozu baskılama, kök hücre ploriferasyonunu ve migrasyonu	***KIT*-/- fare:** sterilite, anemi

Son yıllarda cinsiyet belirlenmesi ve farklılaşmasında epigenetik mekanizmaların rolünün olduğuna dair çalışmalar yayınlanmıştır. DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlanmayan RNA'ların bu süreçlerde önemli işlevlerinin olduğu ve bu mekanizmaların aydınlatılması ile farklılaşma kusuruna yol açan bazı açıklanmamış nedenlerin de çözümlenmesi beklenmektedir (22).

2.1.1. Erkek Cinsiyet Farklılaşması ve Genetik Kontrolü

M.Ö. 384-322 yılları arasında yaşamış olan Aristo, çevresel koşulların cinsiyet tayini üzerine etkili olduğuna, sıcak ve kuru rahimde gelişen yavrunun erkek, nemli ve soğuk rahimde gelişen yavrunun ise dişi olacağını savunmuştur.

İnsan X ve Y kromozomları geçen 300 milyon yıl sürecinde bir çift atasal kromozomdan evrimleşmiştir. X kromozomu bir otozomal kromozomun çoğu özelliğini korurken, Y kromozomu genlerinin çoğunu kaybederek önemli oranda küçülmüştür. İnsan Y kromozomu ökromatin kısmında beş farklı bölge içeren genomik yapıya sahiptir: 1) kısa ve uzun kollarının uç noktalarında iki psödootozomal bölge (*PAR1* ve *PAR2*), 2) 35 kb'lik erkek cinsiyete özgü bölge, atasal otozomdan köken alan ve X-dejenere adlandırılan 8,6 Mb'lık ökromatin bölgenin %38'ni kapsayan bölge, 3) atasal X'e bağlı genlerden 3-4 milyon yıl önce transpozisyonla (X-transpozisyonu) türemiş 3,4 Mb'lik bölge ve 4) amplionik (Y-dizilerinden amplifiye olmuş) ve palindromik diziler içeren, spermatogenezde işlevsel 10,2 Mb'lik bölge (23).

İlk olarak 1990 yılında insan ve farede Y kromozomu üzerindeki *SRY* geninin klonlanmasıyla "**testis belirleyici faktörün (Testis determining factor, TDF)**" varlığı gösterilmiştir (24). Y kromozomunun kısa kolunda (Yp11.32) lokalize *SRY* geni bu bölgedeki farklılaşmadan sorumlu gendir. *SRY* geni *SOX9* geninin anlatımını ve bu gen de *FGF9*'un anlatımını kontrol ederek farklılaşmamış gonadın stromal hücrelerinin Sertoli hücrelerine dönüşmesini sağlar. Sertoli hücrelerinde *SOX9* geni anlatımı, *SF1* ve *SRY* varlığında otokrin etki ile artar. Testis farklılaşmasında *SRY* ile birlikte *SOX9* geninin fonksiyonu da önemlidir. *SOX9* bir taraftan anti-mülleryen hormonun anlatımını artırırken, diğer tarafdan over gelişiminde fonksiyonu olan *DAX1, WNT4, RSPO1* vb. genlerin anlatımını baskılar. *SOX9* geninin fonksiyon kaybı mutasyonları primitif gonadın over yönünde farklılaşmasına yol açar. Kondrositlerde de ifade edilen *SOX9* geninin fonksiyon kaybı mutasyonları, 46,XY cinsiyet farklılaşma bozukluğu ile iskelet displazisinin birlikte görülmesine neden olmaktadır (25).

Gebeliğin 6. haftasının sonunda testis dokusu belirginleşmeye başlar. Primitif cinsiyet kordonlarının *SRY* ve *SOX9* anlatımı ile farklılaşması sonucunda testis kordonları oluşmaktadır. Testiküler farklılaşmanın ilk işareti olan sölemik epitelden köken alan testiküler kordonların oluşumu 43-50 günlük insan embriyosunda primitif gonadın merkezi bölümünde başlar (26,27).

Aşırı miktarda sentezlenen *SF1'*in sölemik epitel hücrelerinin tabakalanmasını sağladığı ve bu hücreler de büyük sitoplazmalı, bol granüllü endoplazmik retikulum içeren ve kompleks membran girinti-çıkıntıları olan öncü Sertoli hücrelerine dönüşmektedir (16). Erkeklerde PGH'ler retinoik asitin etkisinden korunma amacıylaöncü Sertoli hücreleri tarafından çevrelenir ve mitotik duraklamaya girerler (14). Gonadı saran sölemik epitel araya giren yoğun bağ dokusu olan *tunika albuginea* ile testis kordonlarından ayrılır. Testiküler cinsiyet kordonlarının dış bölümleri seminifer tübülleri, iç bölümleri ise ağ benzeri bir yapı olan rete testisi oluşturur (16). Sertoli hücrelerinin farklılaşmasında hücre yüzey molekülü *Vanin1* ve bazal membran bütünlüğünün korunmasında ise *Nexin1* faktörlerinin önemli bir rolü vardır (28).

Erkek genital kanalların oluşumu, paramezonefrik kanalların gerilemesi ve mezonefrik kanalların erkek cinsiyet yönündeki organlara farklılaşması ile tamamlanır. Erkek genital kanal farklılaşmasının ilk işareti 55-60 günlük insan embriyosunda testisin kaudal kutbuna yakın olarak yerleşen paramezonefrik kanalların gerilemesidir (28).

Gebeliğin 8. haftasında Sertoli hücrelerinden Anti-Mülleryen Hormon (AMH)salgılanır. Transforme edici büyüme faktör-beta (TGF-β) ailesinin bir üyesi olan bu hormon, 8-10.haftalarda paramezonefrik kanalın hızlıca gerilemesini sağlar (14). Mezenşimal hücre membranları AMH'yi bağlayan serin-treonin kinaz reseptörleri içerir (9). Mezenşimal hücreler yoğunlaşarak fibröz bir halka şeklini alır ve lümeni daraltır. Daha sonra paramezonefrik kanalın iç yüzünü döşeyen epitel hücrelerinin bazal mebranları eriyerek mezenşimal hücrelere dönüşür (29). Paramezonefrik kanalın gerilemesi: 1) epitel etrafında ekstrasellüler matriks birikimi, 2) matriks metalloproteaz-2 sentezlenmesi ve apoptozis, 3) nukleus içerisinde beta katenin birikmesi basamaklarını içerir (29-31). Yetişkin erkek genital sisteminde, paramezonefrik kanalın kranial ve kaudal uçlarının kalıntılarına, testise yakın appendiks testis ve prostatik üretranın genişlemesi olarak prostatik kesecik şeklinde rastlanabilir (9,30,31).

Erkek genital kanalların farklılaşmasında ikinci basamak, mezonefrozdan köken alan ilkel glomerul ve tubüllerin çoğunun dejenere olarak 2. ayın sonunda tümüyle yok olmasıdır. Erkeklerde geriye kalan tubüllerin bir kısmı ve mezonefrik kanal erkek iç genital yapılarını oluşturmak üzere varlığını sürdürür. Sertoli hücrelerinden salınan iki sinyal molekülü olan Dhh ve Pdgf fetal Sertoli hücrelerinden testosteron salgılanmasını uyarmaktadır (9).

Mezonefrik kanalın üst bölümü epididimise farklılaşırken, alt bölümü ise düz kas tabakaları ile sarılarak, ürogenital sinüse açılan vas deferensi oluşturur (32). Seminel veziküller, 10. haftada mezonefrik kanalların kaudal uçlarının lateralinden dışa doğru tomurcuklar şeklinde belirir. Prostat 10. haftada üretranın prostatik parçasından köken alan çok sayıdaki endodermal çıkıntının mezenşim içerisine büyümesiyle gelişir. Bulboüretral bezler, üretranın spongioz parçasından dışa doğru büyüyen bir çift tomurcuk halinde gelişir (33).

Abdomendeki asıcı ligamentler ve gubernakulum ile böbreğe yakın bir pozisyonda tutunan testislerin skrotuma inişi kompleks bir süreçtir. Bu süreç; testisin büyümesi ve mezonefrik böbreklerin gerilemesi ile başlar ve tutucu ligamentlerin gevşemesi sonucu 8-15. Embriyonal haftalarda testisin inguinal kanala inmesi, 27-30. haftalarda inguinalden skrotuma inişi ile tamamlanır. Testislerin skrotuma inişinde karın içi basınç, testosteron/dihidrotestosteron düzeyleri, androjen reseptörlerinin aktif fonksiyon görmesi ve *AMH, INSL3'ün* (insülin benzeri faktör-3) uygun düzeyde anlatımı gereklidir (34).

2.1.2. Dişi Cinsiyet Farklılaşması ve Genetik Kontrolü

Dişi embriyoda XX genotipine sahip gonadal kabartı hücreleri, Sertoli hücreleri yerine foliküler hücrelere farklılaşır. Paramezonefrik kanallar (Müller kanalı ve türev yapıları) varlığını sürdürür ve fallop tüpleri, uterus ve vaginanın üst bölümünü oluşturmak üzere farklılaşırlar. Overlerin farklılaşmasında etkinolan faktörler henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, primitif gonadın overe dönüşebilmesi için gerekli olan pro-ovaryen genler tanımlanmıştır (28). *WNT4*, mezonefrik ve genital kabartı mezenşimal dokusunda anlatımı olan, overler ile paramezonefrik kanalın oluşmasını sağlayan pro-ovaryen gendir ve eşzamanlı olarak testis gelişiminde etkin rol oynayan *FGF*9 ve *SOX9* anlatımını da baskılayarak testis gelişimini engeller (35). *WNT4* ve *RSPO1* aktivitesi over oluşumunda etkisi olan beta-katenin faktörünü de

stabilize eder. Testis gelişimi üzerinde inhibe edici aktivitesi bulunan diğer bir gen de *DAX1,* X kromozomu üzerinde bulunur ve *SRY* genini engelleyici etki gösterir (28).

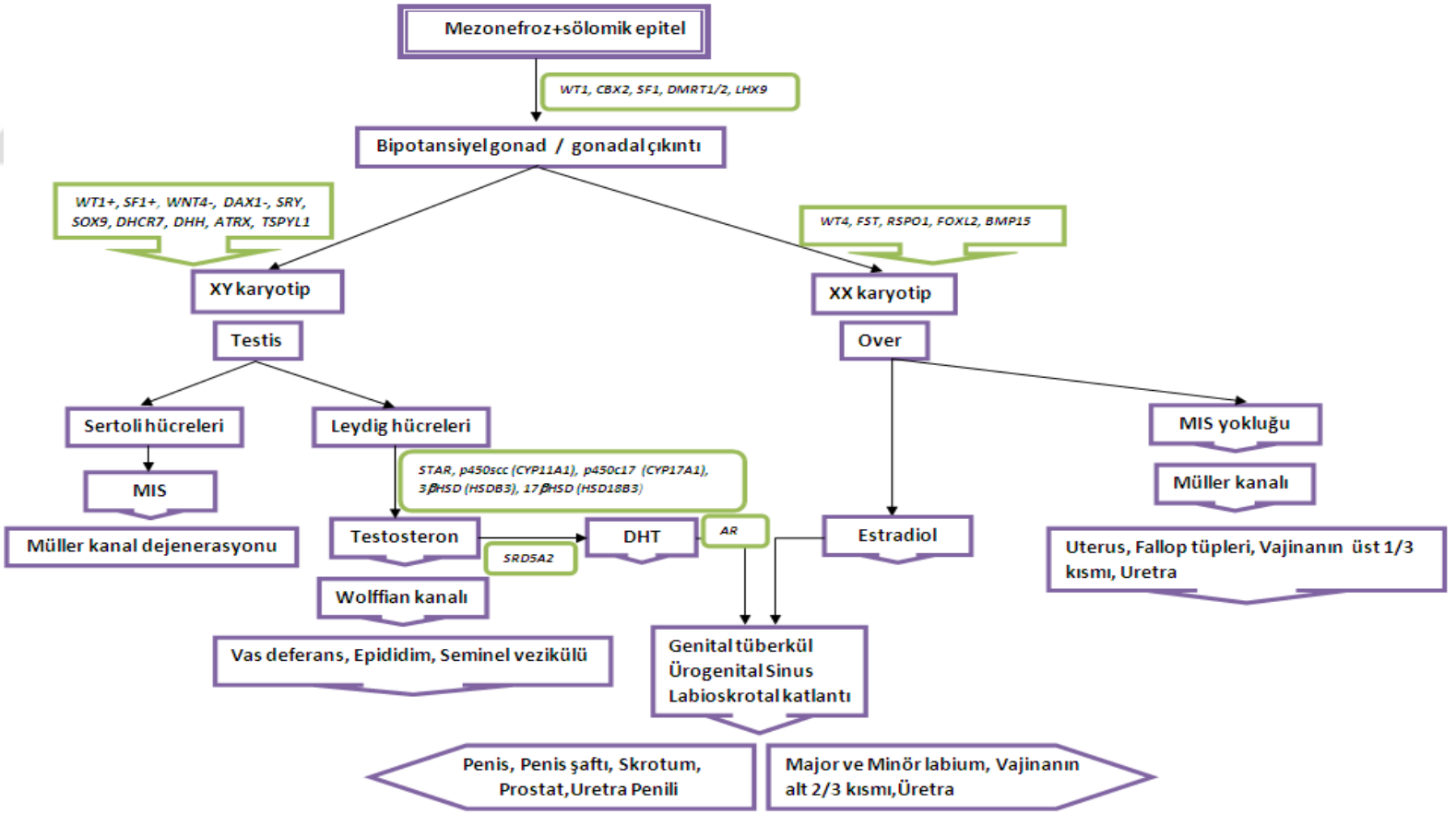
SRY ve öncül Sertoli hücrelerinin yokluğunda, PGH'ler oogonyuma farklılaşır, çoğalır ve 1. mayoz bölünmeye girerek oositlere dönüşür. Oluşan oositler, folikül hücrelerinin farklılaşmasında ve tabakalaşmasında anahtar bir role sahip olan *FIGα* (factor in germline alpha) faktörünü salgılar. *FIGα* folikül oluşumunu ve primitif folikülde zona pellisudanın şekillenmesini sağlar (14,35,36).

PGH'ler primitif gonada ulaştıklarında, dış kortikal bölgede veya kortikomedüler sınırda toplanırlar. Overlerin medüler bölgesi, testise benzer olarak primitif cinsiyet kordonlarını içerir. Bu aşamadaki kordonlar testisteki kordonlar kadar gelişmezler, daha sonraki evrede gelişecek olan kordonlar ise oositleri saracak folikül hücrelerini (granüloza) oluştururlar. Testisteki Sertoli hücrelerinin eşdeğeri olan folikül hücreleri, over yüzey epitel hücreleri (sölemik epitel), mezonefrik hücreler ve genital kabartının mezenşimal hücreleri olmak üzere üç hücre grubundan köken almaktadır (37).

Farklılaşan PGH'ler, oogonya olarak isimlendirilirler ve mitozla çoğalırlar. Dişi fetusta mitoz aktivitesi, 7. ayın sonunda durur ve germ hücrelerinin tümü mezonefrozdan salınan retinoik asitin etkisiyle birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler (19,38). Onuncu haftada oogonyumların mayozun profaz evresine girmesi, histolojik olarak overlerin farklılaşmasının ilk işareti olarak kabul edilmektedir. Mayoza giren oogonya oosit olarak isimlendirilir ve folikül hücreleri tarafından sarılarak **primitif folikülleri** oluştururlar. En erken primitif folikül 15. haftada, ilk graaf folikülü ise 23. haftada izlenir (39). Gebeliğin 7.ayında mitotik aktivite sonlanır, oositler birinci mayozun diploten evresine kadar mayoz bölünmeye devam eder, daha sonra duraksama fazına girer ve pubertede ovulasyon dönemi başlayıncaya kadar bu evrede kalırlar. Gebeliğin 25. haftasında 6-7 milyon olan primitif folikül sayısı doğuma kadar yaklaşık iki milyona düşer. Oositlerin çoğu apoptozise, foliküller ise atreziye uğrar. Doğumdan sonra ise yeni primitif folikül oluşmaz (40).

Testislerdeki Leydig hücrelerinin eşdeğeri olan teka hücrelerinin de granülosa hücrelerinin kontrolü altında over stromasındaki fibroblast benzeri öncül hücrelerden köken aldığı düşünülmektedir. Over korteksi oositleri, medüllası ise mezonefrozdan gelişen stromal hücreleri, bağ dokusu ve kan damarlarını içerir (9,16).

Dişilerde ana genital kanallar paramezonefrik kanallardan oluşur (16). Başlangıçta her kanalda 1) karın boşluğuna açılan kranial parça, 2) mezonefrik kanalları çaprazlayan horizontal kısım ve 3) karşı taraftan gelen eşiyle birleşen kaudal kısım olmak üzere 3 bölüm bulunur ve bunların ilk ikisinden uterus gelişir. Posterior pelvik üretra duvarına temas etmeden önce paramezonefrik kanalın distal uçları birbirine yaklaşarak büyür. Pelvik üretranın duvarı bu noktada hafifçe kalınlaşarak iki çıkıntı şeklinde sinovajinal tuberkülü oluşturur. Paramezonefrik kanal sinovajinal tuberküle temas ederek uterovaginal kanalı oluşturmak üzere kaynaşırlar. Bu tüp uterusu ve vajinanın üst kısmını oluşturur (14,16). Gelişimin 4-7. haftalarında kloaka, ürorektal septum adı verilen mezodermal bir doku ile önde ürogenital sinüs ile arkada ise anorektal kanala ayrılır. Ürogenital sinüsün en üstteki büyük parçası mesaneyi oluşturur. Ortadaki ikinci parça pelvik sinüs, son parça da kalıcı ürogenital sinüsü oluşturur. Sinovajinal tüberkül adı verilen bu çıkıntılar, hızlıca çoğalarak solid vajinal plağı oluştururlar. Vajen epiteli ürogenital sinüsün endoderminden köken alırken, fibromüsküler doku çevre mezenşiminden gelişir. Vajina lümeni, ürogenital sinüsden himen adı verilen ince bir doku plağı ile ayrılır. Dişilerde üretradan çevre mezenşim içerisine doğru olan tomurcukların büyümesi ile üretral ve paraüretral bezler gelişir. Bu bezlerin erkekteki karşılığı prostat bezidir. Ürogenital sinusdan dışa doğru olan tomurcuklardan da erkekteki bulboüretral bezlerin homoloğu olan Bartholin bezleri gelişir (14,33) (Şekil 2-4). Testisler kadar hızlı ve belirgin olmasa da overler de pozisyonlarında kaudale doğru bir değişiklik geçirirler. Büyümeleri ve paramezonefrik kanallar ile olan bağlantıları nedeniyle overler mezonefroz kökenli ligamentlerin eşliğinde kaudale ve laterale hareket ederler (9).



Şekil 2-4. Cinsiyet farklılaşması aşamalarının şematik gösterimi.

2.1.3. Cinsiyet Farklılaşmasında Rol Alan Genler

Cinsiyet gelişimi primordial gonadın testis veya over olarak gelişimine yol açacak olan cinsiyetin belirlenmesi (*sex determination*) ve testis/overlerden salınan hormonların yardımı ile iç ve dış genital yapının şekillenmesi ile üreme işlevinin kazanılmasını sağlayacak olan cinsel farklılaşma (*sex differentiation*) olarak bilinen birbirini takip eden iki ayrı basamaktan oluşur (7). Her iki basamakta görevli genlerin kodladığı proteinler uygun gelişim evresinde, uygun dozda ve etkin olarak, engelleyici ve uyarıcı mekanizmalarla denge içinde çalışmaktadır. Bu süreçte işlevsel olan genlerin özellikleri etkili olduğu gelişim evresi ve anlatımı yapılan doku temel alınarak sınıflandırılmıştır (Tablo 2-2).

Tablo 2-2. Cinsiyet farklılaşmasında rolü olan genlerin sınıflandırılması ve fonksiyonel yansımaları.

Gen / Lokus	Tipi	İşlevi	Gen Mutasyonları ve Fenotipik etkileri
A. Farklılaşmamış (bipotansiyel) gonadda			
PAX2 10q24.31	Paired-box ailesinin üyesi, transkripsiyonel regülatör	Ürogenital sistemin kanal ve mezenşim kökenli yapılarının gelişimi	**OD-:** Genitoüriner anomalilerin eşlik etmediği renal-kolobom sendromu ***PAX2* -/- fare:** böbrek, üreter ve genital kanalların agenezi, ürogenital sistemin tüm duktal ve mezenşimal kökenli yapıların disgenezisi
EMX2 10q26.11	*Drosophila* gap geni homoloğu, Homeobox içeren transkripsiyon faktörü	Ürogenital sistemin epitel kısımlarının ve telensefalonun dorsal gelişimi	Kalıtım **?**- şizensefali (nadir), endometrial karsinomlarda somatik mutasyonlar ***EMX2* -/- fare:** kusurlu sölemik epitel kalınlaşması, Wolf kanallarının dejenerasyonu ve Müller yapılarının oluşmaması
LHX9 1q31.3	LIM homeobox gen ailesinin üyesi, transkripsiyon faktörü	Ürogenital çıkıntı gelişimi Sf1'nin anlatımını uyarma	*İnsanda etkisi tanımlanmamış* ***LHX9* -/- fare:** genital kabartı alanındaki hücrelerin kusurlu ploriferasyonu, çizgi gonad oluşumu
WT1 11p13	Çinko parmak transkripsiyon faktörü	Ürogenital kabartı, mezonefroz, böbrek ve gonadal dokuların (sölemikepitel hücre tabakalarının tümü, erkeklerde sertoli ve dişilerde granüloza hücreleri) gelişimi	**OD-:** Wilms tümörü, izole diffüz mezangiyel skleroz, aniridi, genitoüriner anomaliler ile ilişkilendirilmiş, bazı sendromlar ve birliktelikler (WAGR, Frasier, Denys-Drash, Meachan) ***WT1* -/- fare:** gonadal primordium görülmesine rağmen, **PGH'lerde** artmış apoptozis nedeniyle dejenerasyon
GATA4 8p23.1	Transkripsiyon faktörü	Sertoli hücrelerinin doğru lokalizasyonunda (ektopik yerleşimin önlenmesi) ve testislerde kord gelişimi	**OD-:** kardiyak defektler, şüpheli dış genital yapı (nadir) ***GATA4* -/- fare:** letal fenotip bildirilmemiş

B. Testis gelişiminde görevli genler			
SRY Yp11.2	HMG box DNA bağlama domeini içeren çekirdek proteinleri ailesinin üyesi, transkripsiyon faktörü	Testiküler farklılaşma ve erkek cinsiyet gelişimi	Gonadal disgenezi, 46,XX CGB ve ovotestiküler CGB
SOX9 17q24.3	Transkripsiyon faktörü	Farklılaşan Sertoli hücreleri, primordial gonadın destek hücrelerinin gelişimi	**OD-:** 46, XY CGB Gen ***duplikasyonları*** ise 46, XX CGB
SF1/NR5A1 9q33.3	Çinko parmak transkripsiyon faktörü	Ürogenital kabartı, hipotalamus ve hipotalamus-hipofiz-gonadal aksın gelişimi, steroidojenik enzim ve faktörlerin uyarımı	**OD-:** Mülleriyen yapıların korunduğukomplet testiküler disgenezi; ***Heterozigot*** mutasyonları ovaryen yetmezlik ile ilişkilendirilmiş ***SF1* -/- fare:** adrenal ve gonadal yapıların gelişmemesi, hipotalamus anomalisi
DAX1/NR0B1 Xp21.2	Orfan nüklear resptör ailesinin üyesi, transkripsiyonel regülatör	SF1 trans aktivasyonunda represör, adrenal bezlerin, gonadların ve hipotalamus-hipofiz gelişimi	**X'e bağlı resesif-:** konjenital adrenal hiperplazi (glukokortikoid ve mineralokortikoid eksikliği ile giden adrenal yetmezlik); X kromozomunun geni içeren ilgili bölgesinin ***duplikasyonu*** doz duyarlı cinsiyet dönüşümü ile ilişkili; ***DAX1* -/- fare:** hatalı testiküler gelişim
DMRT1 9p24.3	Transkripsiyon faktörü	Postnatal testis gelişimi	**OD-:** testis gelişiminde bozukluk ***DMRT1* -/- fare:** postnatal testis farklılaşmasında bozukluk
FGF9 13q12.11	Sinyal molekülü	Sertoli hücre farklılaşması, testiküler kord gelişimi	***FGF9* -/- fare:** belirgin gonadal fenotipin oluşmaması
DHH 12q13.12	Sinyal molekülü	Leydig ve peritübüler myoid hücre işlevlerinin regülasyonu	**OR-:**46,XY komplet gonadal disgenezi ***DHH* -/- fare:** Bozuk peritübüler doku nedeniyle testiküler kord oluşamaması
CBX2/M33 17q25.3	Transkripsiyon baskılayıcı	Kromatin yapıda değişikliklerle erken gonadal gelişimde ve adrenal bezlerde Sf anlatımının regülasyonu	**OR-:** 46,XY CGB ***CBX2* -/- fare:** cinsiyet dönüşümü
TSPYL1 6q22.1	Kromatin düzenleyici	Testosteron üretimi, gonadal kesenin oluşumu ve penil şaft oluşumu	**OR-:** yaşamın erken dönemlerinde vissero-otonom disfonksiyon, testiküler disgenezi
MAMLD1 Xq28	Transkripsiyon aktivatörü	Fetal Leydig ve Sertoli hücrelerinde anlatımı yapılarak testosteron üretimi	**X'e bağlı resesif-:** şüpheli genitalya, hipospadias
PGDS2 9q34.3	Enzim	*SOX9* anlatımının ve nüklear translokasyonun düzenlenmesi	***PGD2S* -/- fare:** gecikmiş testiküler organizasyon ve uni/bilateral testisküler migrasyon hatası
C. Over gelişiminde görevli genler			
RSPO1 1p34.3	Trombospondin -benzeri beta-katenin aktivatörü	Gelişmekte olan overlerde beta-katenin gen anlatımının düzenlenmesi	**OR-:** palmoplantar keratozis ve cinsiyet gelişim anomalisi ***RSPO1* -/- fare:** Persistan Wolf kanalları ile birlikte parsiyel cinsiyet dönüşümü

WNT4 1p36.12	Sinyal molekülü / büyüme faktörü salgılatıcı	Müller kanalları ve over gelişimi	**OD-:** Mülleriyen aplazi ve hiperandrojenizm ***WNT4* -/- fare:** overlerde düşük sayıda oositin gözlenmesi, kısmi cinsiyet dünüşümü
FOXL2 3q22.3	Transkripsiyon faktörü	Erken over farklılaşmasında etkili, GnRH hormon reseptör anlatımının uyarımı	**OD-:** Blefarofimoz-ptoz-epikantus inversus sendromu, gonadal disgenezi
D. Müller yapılarının gelişiminde görevli genler			
AMH 19p13.3	TGF-β ailesinin üyesi	Müller kanallarının apoptozisini uyarma	**OR-:**Persistan Mülleriyan Kanal sendromu
HOXA10 7p15.2	Transkripsiyon faktörü	Epitelyal-mezenkimal etkileşimi uyarma, Mülleriyan ve ürogenital kanal gelişimi	Kalıtım **?** - uterin ve genital malformasyonlar
Lim1/LHX1 17q12	Transkripsiyon faktörü	Kafa ve böbrek gelişimi, mezonefrik-metanefroz, gonadal gelişimde etkin	***LHX1* -/- fare:** genital yarık agenezi

Testis Gelişiminde Rol Alan Genler

Gonad gelişiminde anahtar rolü olan *SRY*'nin anlatımı,*WT1, SF1, GATA4* ve kofaktörü *ZFMP2* ve *CBX2* tarafından düzenlenmektedir. *SRY*'nin hedef geni *SOX9*'dur ve *SRY, SF1* ile birlikte TESCO'ya (testis spesifik SOX9 anlatımını arttırıcı çekirdek elementi) bağlanarak anlatımını arttırmaktadır. *SOX9* anlatımının artışı ile Sertoli hücre gelişimi ve testisküler farklılaşma başlar. *SOX9* aynı zamanda *AMH* anlatımını da uyarır. Farklılaşma için ayrıca, *AMH, DHH* ve *FGF9* anlatımının uyarılmasına da ihtiyaç vardır. *AMH* anlatımının artması ile over gelişiminde etkili olan genlerin (*RSPO1, FOXL2, WNT4, DAX1*) anlatımı da baskılanır. *DAX1*, hem testis hem de over gelişimi için gereklidir, doza duyarlı etki gösterir. *DMRT1* (double sex/mab ilişkili transkripsiyon faktörü 1) promordial gonad gelişimi ve testise özgü faktör olarak etki gösterir. *SRY* uyarısından sonra *DHH* (desert hedgehog) geninin Sertoli hücrelerinde anlatımı yapılır ve germ hücrelerinin mayoz/mitoz bölünmelerini düzenler. *SOX3*'ün mutasyonlarının da ektopik ekspresyona ve cinsiyet değişimine neden olduğu bilinmektedir (7).

Over Gelişiminde Rol Alan Genler

SRY'nin yokluğunda, *RSPO1* (R-spondin-1) *WNT4* ile birlikte β-katenin sinyal yolağını uyarır ve bunun sonucunda *SF1*'in TESCO'ya bağlanması engellenir, böylece testis yönündeki farklılaşma gerçekleşemez. β-katenin, normal hücre büyümesinin sağlanmasında kaderin adhezyon moleküllerinin kuyruk kısmına bağlanarak birleştirici

kavşak protein olarak görev almaktadır. *RSPO1* anlatımı ile *DAX1*'in etkisi artarken, *SF1* anlatımı baskılanmaktadır. *WNT4*'ün over farklılaşması yanında her iki cinsiyette başlangıçta Müller yapılarının gelişiminde etkili olduğu, iki yönlü olarak gonadal farklılaşmada etkili olduğu bilinmektedir. *WNT4*'ün testislerdeki anlatımı *FGF9* tarafından engellenir. Follistatin (*FST*) granüloza hücrelerinden salınarak *WNT4* yolağını antisens faktör olarak etkilemektedir (7).

2.2. Cinsiyet Gelişim Bozuklukları (CGB)

Cinsiyet kromozomal olarak (XX veya XY) zigot aşamasında belirlenir ve bu da daha sonraki aşamalarda gonad gelişimini ve anatomik yapının oluşumunu etkiler. Bu gelişim sürecinde birçokgen rol almaktadır. Kromozomal ya da tek genlerde oluşan mutasyonların yol açtığı kromozomal cinsiyet ile uyumsuz gonad ve/veya anatomik cinsiyet gelişim sorunları "Cinsiyet gelişim bozuklukları (CGB, DSD:Disorders of Sexual Development)" olarak tanımlanır ve heterojen bir grubu oluşturur. Prevalansı ve insidansı ile ilgili veriler kısıtlı olsa da genel olarak insidansın 1:5500 olduğu ve tüm doğumsal anomalilerin %7'sinden fazlasını oluşturduğu bildirilmektedir (1-3,41). Genital fenotipin çok geniş bir spektrumda gözlenmesi (erkeklerde hafif hipospadiasdan dişilerde büyümüş klitorise kadar) ve genotip-fenotip ilişkisinin zayıf olması patolojileri kesinsınırlar içinde tanımlamayı güçleştirmektedir. CGB'nin klinik sınıflaması yakın zamanlara kadar gonadların over veya testis dokusunu içermesine göre yapılırken, yeni sınıflamada karyotip ön plana çıkmaktadır (4,6). Bu sınıflandırmaya göre CGB olguları üç ana grubta değerlendirilmektedir: cinsiyet kromozom anomalilerine bağlı CGB, 46,XY CGB ve 46,XX CGB (2) (Tablo2-3).

Tablo 2-3. CGB'nin karyotip temelli sınıflandırılması (4).

Cinsiyet Kromozom Anomalilerine bağlı CGB	**46, XY CGB**	**46, XX CGB**
a. 47,XXY (Klinefelter sendromu ve varyantları) **b. 45,X (Turner sendromu ve varyantları)** **c. 45,X/46,XY (miks gonadal disgenezi)**	**a. Gonadal (testiküler) gelişim bozuklukları** ı. Tam veya kısmi gonadal disgenezi (*SRY*, *SOX*9, *SF1*, *WT1*, *DHH* vb.) ıı. Ovotestiküler CGB ııı. Testiküler regresyon sendromu	a. **Gonadal (ovaryan) gelişim bozuklukları** ı. Gonadal disgenezi ıı. Ovotestiküler CGB ııı. Testiküler CGB (*SRY*+, dup*SOX9*, *RSPO1*) **b. Androjen fazlalığı** ı. Fetal

d. 46,XX/46,XY (kimerizm)	**b. Androjen sentez veya işlevindeki bozukluklar** ı. Androjen sentezindeki bozukluklar LH reseptör mutasyonları Smith-Lemli-Opitz sendromu Steroidojenik akut regülatör protein mutasyonları Kolesterol yan zincir yarıklanmaları (CYP11A1) 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz 2 eksikliği (HSD3B2) 17α-hidroksilaz/17,20-liyaz eksikliği (CYP17) P450 oksidoredüktaz (POR) kusuru 17β-hidroksisteroid dehidrogenaz eksikliği (HSD17B3) 5α-redüktaz 2 eksikliği (SRD5A2) ıı. Androjen işlevindeki bozukluklar Androjen duyarsızlık sendromları İlaçlar ve çevresel etkiler **c. Diğer** ı. sendromik birliktelikler (kloakal anomaliler, Robinow, Aarskog, El-Ayak-Genital, popliteal pterygium) ıı. Persistan Müllerian Kanal Sendromu ııı. Vanishing testis sendromu ıv. İzole hipospadias (*CXorf6*) v. Konjenital hipogonadotropik hipogonadizm vı. Kriptorşidizm (*INSL3*, *GREAT*) vıı. Çevresel etmenler	3β-hidroksisteroid dehidrogenaz 2 eksikliği (HSD3B2) 21-hidroksilaz kusuru (CYP21A2) P450 oksidoredüktaz kusuru (POR) 11β-hidroksilaz eksikliği (CYP11B1) Glukokortikoid reseptör mutasyonları ıı. Fetoplasental Aromataz (CYP19) eksikliği Oksidoredüktaz (POR) eksikliği ııı. Maternal Maternal virilize tümörler (lüteomalar) Androjenik ilaçlar **c. Diğer** ı. Sendromik birliktelikler (kloakal anomaliler) ıı. Mülleryen ageneziler/hipoplaziler (MURCS) ııı. Uterus anomalileri (MODY5) ıv. Vajinal atreziler (McKusick-Kaufman) v. Labial adhezyonlar

2.2.1. Cinsiyet Kromozom Anomalilerine Bağlı CGB

Cinsiyet kromozom anomalileri, sayısal ve/veya yapısal olabilir, tüm hücrelerde veya mozaik olarak bulunabilir. Anöploidiler, mayoz veya mitoz bölünmede meydana gelen ayrışma hatalarının (non-disjunction, anafazda lag) yol açtığı en sık rastlanan kromozomal bozukluklardır. Moleküler genetik çalışmalar trizomilerin önemli bir bölümünün mayoz I ve II'de meydana gelen non-disjunction, monozomilerin ise anafazda geri kalma ile oluştuğunu göstermiştir (41). Canlı doğumlarda en sık görülen cinsiyet kromozom anomalileri XXY, XXX ve XYY gibi trizomilerdir. Buna karşın, X monozomisi (45,X; Turner sendromu) spontan abortus materyalinde en sık rastlanan kromozomal anomalisidir .

2.2.1.1. 47, XXY (Klinefelter sendromu ve varyantları)

Klinefelter sendromu, erkeklerde en sık gözlenen cinsiyet kromozom anomalisidir(erkek yenidoğanlarda yaklaşık 1/500) (42). Erişkin genetik kaynaklı infertilitenin en sık nedenidir ve azospermik olguların %11'indegözlenir (43). İlk kez Harry F. Klinefelter tarafından 1942 yılında, jinekomasti, küçük testisler, spermatogenezin olmaması, Leydig hücrelerinin normal veya azalmış fonskiyon göstermesi, FSH düzeylerinin yüksek olması ile karakterize bir klinik tablo olarak tanımlanmıştır (44). Etkilenen kişilerin %80'i klasik XXY karyotipi, diğerleri 48,XXXY, 48,XXYY, 49,XXXXY gibi varyantlar veya mozaisizm (46,XY/47,XXY) gösterirler (45). *SRY* pozitif 46,XX karyotipi de Klinefelter varyantları arasında yer almaktadır ve prevalansı 1/20.000-25.000 olarak bildirilmiştir (46). Fazla X kromozomu % 40-60 paternal kaynaklıdır ve paternal kaynaklı fazla X krozomuna sahip olgularda pubertenin daha geç başladığı ve yavaş ilerlediği bildirilmiştir (47). Epizodik konvüzyon, şizofreni benzeri ve paranoid bozukluklar, obsesyon ve tedaviye yanıtlı epilepsi bu olgularda görülebilen bulgulardır (48). Jinekomasti, bu sendromun major klinik bulgularından biri olarak düşünülür. Bu olgularda normal bebeklere göre altı kat fazla sıklıkla (%4.5-68.7) inmemiş testis görülür (48). Bebeklik döneminde mikropenis görülen olguların puberte öncesi dönemde de fallus boyları yaş ortalamasından küçüktür. Major bulgulardan olan hipogonadizm adolesan ve erişkin dönemde belirginleşir (49).

Klinefelter olgularının yaklaşık yarısında altta yatan neden, paternal mayoz I'de hata ile sonuçlanan psödootozomal bölgedeki Xp/Yp rekombinasyonu sürecindedir.

Diğer olgularda ise nedenin, maternal mayoz I veya mayoz II'deki ya da mozaisizme neden olan post-zigotik mitotik hatalar olduğu bildirilmiştir. Olguların %15'inde karyotip mozaiktir. Mozaik hasta grubunda fenotip değişkendir; bazılarında normal testiküler gelişim gözlemlenebilir (41).

2.2.1.2. 45, X (Turner sendromu ve varyantları)

Turner sendromu, dişilerde 1/2000 sıklıkla görülen, ikinci cinsiyet kromozomunun yokluğu ya da yapısal anomalisi sonucu oluşan bir sendromdur (50,51). Prenatal dönemde letal olduğundan etkilenmiş fetusların yalnızca %1'i canlı doğabilmektedir ve bunların da mozaik olgular olduğu düşünülmektedir (52). X kromozomu için monozomi, gametlerden birine seks kromozomu katılmaması veya erken embiyonik dönemde seks kromozomun kaybıyla meydana gelir. Periferik kan incelemelerinde Turner fenotipli olguların yarısında 45,X karyotipi, %15'inde 45,X/46,XX mozaisizmi diğerlerinde X ve Y derivatifleri ve mozaikleri saptanır (53). Yaşamla bağdaşan tek monozomi örneği 45,X karyotipi olup, kaybolan kromozomun X ya da Y oluşuna bağlı olarak Turner sendromuna veya Miks gonadal disgenezisine yol açar (42). Turner sendromlu olgularda fenotipin belirlenmesinde, mozaik ya da klasik 45,X karyotipinin, X kromozomunun embriyonik dönemde kaybolma zamanının, mozaisizm oranının ve dokulara dağılımının ve seçici inaktivasyonla yapısal X kromozomu anomalisinin üzerindeki genlerin sessizleştirilmesinin ilişkisi vardır. Turner sendromu, lenfatik displazi, gonadal disgenezi, kardiyak ve renal malformasyonlarla karakterizedir (53). Yenidoğanda el ve ayak üstlerindeki ödemler çok tipik bulgudur ve zamanla kaybolur. Kısa boy en temel bulgudur, kubitus valgus ve ergenlikte sekonder seks karakterlerinin gelişmemesine neden olan, fibroz bant şeklindeki overler ve hipergonadotropik hipogonadizmle prezente olan primer amenore ile tanı alırlar (54).

2.2.1.3. Miks Gonadal Disgenezi (MGD)

Histopatolojik olarak bir tarafta disgenetik testis diğer tarafta streak gonad varlığı, sitogenetik olarak 45,X ve 46,XY veya Y derivatifi içeren, en az 2 hücre dizisinin oluşturduğu mosaisizm ile karakterizedir (55). Her iki tarafta farklı derecelerde testiküler farklılaşma gösteren asimetrik gonadal disgenezi (bilateral streak testis veya disgenetik testis) olarak tanımlanır. Fenotip olarak % 90 normal erkek (tıbbi inceleme yapılmaz) ve % 10 kuşkulu genital yapı veya Turner sendromu fenotipi gösterirler ve fenotip oluşumunu etkileyen faktörler, mozaisizmin oranı ve Y/Y derivativ

kromozomunun kaybolma zamanıdır. Y veya Y derivatifi içeren mozaisizm saptanan MGD olgularında yüksek gonadoblastom (1/3) riski nedeniyle en kısa zamanda bilateral gonadotektomi önerilir ve bu kız olarak yetiştirilen olgularda virilizasyonu önlemek için de önemlidir. Erkek olarak yetiştirilmesine karar verilen olgularda gonadektomi için yakın takip ile puberteye kadar beklenebilir. MGD olgularında, immünoglobulin yetersizliği, iç kulaktaki kemiklerde hatalı gelişim, kardiovasküler ve renal anomaliler daha sıktır (55-57).

2.2.2. 46,XY CGB

46,XY CGB olguları yetersizmaskülinizasyon ve Müller yapılarının var olup/olmaması nedeniyle dış genital yapının şüpheli veya yetersiz virilize olması ile karakterize edilir. Virilizasyonun hiç olmadığı olgularda normal dişi dış genital yapı gözlemlenirken, olgular meme gelişiminin olmaması ve/veya primer amenore nedeniyle sadece pubertal dönemde tanı alırlar (58).

2.2.2.1. Gonadal Disgenezilerin Neden Olduğu 46,XY CGB

Gonadal farklılaşmanın herhangi aşamasında etkili genlerdeki mutasyonun şiddeti ve yolaktaki lokalizasyonuna bağlı olarak bipontansiyel gonadın normal testise farklılaşmaması, streak gonad veya disgenetik testis oluşumu gözlenir (58). 46,XY gonadal disgeneziler tam ve kısmi olmak üzere iki grupta değerlendirilir ve genetik açıdan heterojen (otozomal, X'e ve Y'e bağlı) bir grubu oluşturur. Tam 46,XY gonadal disgenezili olgularda dış genital yapı tamamen normal dişi görünümünde olup streak gonadlarda testosteron ve AMH üretimi olmadığından Mülleriyen yapılar uterus ve fallop tüpleri gelişir. Bazı olgularda Turner stigmatları bulunabilir (8). 46,XY tam gonadal disgenezili olguların en sık görüleni gonadoblastom olmak üzere gonadal tümör riski yaklaşık %30'dur (59). Disgenetik testis veya streak gonad dokusunda germ hücre kökenli tümör gelişiminin erken taramasında dokuda OCT3/4 (primordial germ hücrelerinde anlatımı yapılan octamer-binding transcription factor) ve TSPY (testis hücrelerinin mitotik ploriferasyonunda etkili testis spesifik protein) anlatımlarının birlikte değerlendirilmesi displastik hücrelerin varlığını erken tanısında yol göstericidir (60). 46,XY kısmi gonadal disgenezilerde ise sentezlenen testosteron miktarına bağlı olarak değişik derecelerde virilizasyon gözlemlenir ve iç-dış genital yapılar bu yönde şekillenir. Bu olguların hCG uyarısına testosteron cevabı yetersizdir (8). Gonadların durumu ve histolojisi 46,XY tam gonadal disgeneziler ile benzerdir (61). Benzer fenotip

mozaik 45,X/46,XY olgularında da gösterilmiştir (58). Bu heterojen olgu grubunda, *SRY* geninde (yaklaşık %10-15), *DSS* (dozaja duyarlı cinsiyet lokusu, *dosage sensitive sex lokus*) duplikasyonu veya otozomal genlerde (*WT1, SF1, SOX9, DHH*) mutasyonlar bildirilmiştir (4,8,61,62).

2.2.2.2. Testiküler Regresyon Sendromu

Fetal dönemde normal gelişim gösteren testisin zamanla atrofiye uğrayarak kaybolması (*vanishing* testis), kör uçlu ve işlevsel olmayan spermatik kord ve uni/bilateral testiküler dokunun tam regresyonu ile karakterize durumdur (63-65). Sıklığı 1/1250'dir (66), palpe edilemeyen testisli erkek çocukların %64'ünde inmemiş testis, %22,5'inde testis-vas deferens-epididim agenezisi, %15'inde kör uçlu vas deferens, %25'inde ise kör uçlu vas deferens ile birlikte inguinal kanalda damar yapısının olduğu bildirilmiştir (67). İnmemiş testisli olguların %10-20'sinde testis palpe edilemez ve bu olguların %35-60'ında testiküler regresyon olduğu belirtilmiştir (68-71). Testiküler regresyonun perinatal veya postnatal vasküler tromboz, torsiyon veya hormonal dengesizliklere bağlı olduğu, patolojik incelemelerde fibrotik ve distrofik alanların varlığı ve dev hücrelerin izlenmesi durumun iskemik olay sonucunda oluştuğunu göstermektedir (72,73). Genetik sebepleri günümüzde bilinmemesine rağmen bir çalışmada mikropenis ve testiküler regresyonu olan bir erkek çocukta *SF1* geninde heterozigot p.V355M varyantı bulunduğu bildirilmiştir (58).

2.2.3. Androjen Sentez Kusurlarına Bağlı 46,XY CGB

Androjen sentez bozuklukları kolesterolden testosteron sentezi yolağındaki enzim/lerin kusuruna bağlı olarak, yolağın tüm basamaklarında, fetal Leydig hücrelerinden salgılanmada veya 5α-dihidrotestosterona dönüşüm sürecinde görülebilir (74). 46,XY CGB olgularının tipik fenotipi, androjen sentez bozukluğunun nedenine bağlı olarak dişi dış genital yapısından hafif etkilenmiş erkek dış genital yapısına kadar geniş yelpazede değişir.

2.2.3.1. Hatalı Leydig Hücre Farklılaşması, LH Reseptör Bozukluğuna Bağlı 46,XY CGB

Leydig hücre sayısı, intrauterin ilk trimester, yenidoğan ve pubertal evre olmak üzere üç ayrı dönemde artış gösterir (39). Leydig hücre gelişiminde *DHH, PDGF-A* ve *ARX* genlerinin etkin olduğu bildirilmiştir (40-42). Leydig hücrelerinin sayıca artması, olgunlaşması ve testosteron sentezlemesi embriyonel dönemin ilk günleri haricinde

genel olarak hCG/LH etkisi ile düzenlenmektedir (43). Embriyonik dönemde, gonadda Leydig hücre oluşumundan ve LHR (Leydig Hücre Reseptörü) sentezinden sorumlu olan genlerdeki inaktive edici mutasyonlar ve delesyonlar testosteron sentezini etkilemektedir. Buna bağlı oluşan klinik tablo, üretilen testosteronun miktarına ve bozukluğun kendini gösterdiği zamana göre dişi fenotipin oluştuğu ağır formdan, sadece infertilite bulgusunun görüldüğü hafif formlarakadar değişkenlik gösterir (45). Leydig Hücre Hipoplazisi Tip 1 de 46,XY birey dişi dış genital yapısı ile doğar ve kız olarak yetiştirilirler. Bu olguların Müller yapıları yoktur, testisler küçük ve skrotuma inmemiştir, bazal testosteron düzeyleri de düşüktür (30). Testosteronun kısmen de olsa sentezlendiği Tip 2 olgularında ise mikropenis, hipospadias ve yetersiz virilizasyon bulguları görülür (30).

2.2.3.2. Kolesterol Sentez Bozukluklarına Bağlı 46,XY CGB. Smith-Lemli-Opitz Sendromu ve Diğerleri

Kolesterolün endojen sentezi asetatla başlar, skualene kadar (preskualen sentez) 8, skualenden sonra ise 2 basamak olmak üzere sterol yolağındaki ilk molekül olan lanosterol sentezi gerçekleşir (75). Postskualen kolesterol sentezi enzim bozuklukları ile ilişkili dört OR hastalık tanımlanmış olup en iyi bilineni, sterol delta – 7 redüktaz eksikliğine bağlı Smith Lemli Opitz (SLO) sendromudur (76). Diğerleri ise latoskleroz, desmoskleroz ve SC4MOL eksikliğidir (77). Kolesterol sentez yolağındaki bozukluklara ilişkin ağır dismorfik bulguların da eşlik ettiği diğer sendromlara örnek Conradi-Hünerman-Happle, Antley-Bixler ve CHILD (İktioziform Eritodemanın eşlik ettiği Konjenital Hemidisplazi ve Ekstremite Anomalileri) olarak gösterilebilir.

2.2.3.3. Adrenal ve Testiküler Steroidogenez Enzim Kusurlarına Bağlı 46,XY CGB

Bu gruba steroidojenik akut düzenleyici proteini (StAR) ve P450scc eksikliği; 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz tip 2, 17-hidroksilaz,17-20 liyaz ve 17βHSD-3 enzim bozuklukları dahildir.

Konjenital Lipoid Adrenal Hiperplazi (LKAH), adrenal ve gonadal steroid sentezinin etkilenmesi ile ortaya çıkan OR kalıtılan, Amerika ve Avrupada nadir, Japonyada ise adrenal hiperplazinin ikinci sık nedeni olan hastalıktır (78). Olguların birçoğunda kolesterolün mitokondri içine geçişini sağlayan StAR proteinini kodlayan gende (*StAR*) mutasyonlar bildirilmiştir (79,80). Steroid sentezinin bir bölümü StAR'dan bağımsız olarak gerçekleşir ve pregnenolana dönüşüm yolağının bu tipinin

oranı % 14'dür (78,81). Fetal dönemde testosteron sentezinin önemli bir kısmı testis tarafından yapıldığı için LKAH olgularında Leydig hücreleri gebeliğin erken dönemlerinde yıkıma uğrar, testosteron yetersizliğine bağlı olarak virilizasyon oluşmaz ve dış genital yapı dişi cinsiyet yönünde oluşur (82). Bu süreçte Sertoli hücreleri etkilenmediğinden AMH salınımı normal gerçekleşir ve mülleriyen yapılar izlenmez (79). Klasik formunda testisler inguinal yerleşimli olup, disgenetik değildir (83). Filistinli LKAH olgularının çoğunda *StAR* geninde proteinde erken terminasyon ve takibinde trunkusyona neden olan c.201-202delCT kurucu (*founder*) mutasyonu tanımlanmıştır (84). LKAH olgularında yaşamın ilk birkaç ayında adrenal yetmezlik veya tuz kaybı gözlemlenirken, nonklasik tiplerinde adrenal hiperplazi gösterilmemiştir. Non klasik tiplerde StAR aktivitesinin %10-25 civarında olduğu, normal dış genital yapıya sahip oldukları ve en yaygın mutasyonun p.R188C olduğu bildirilmiştir (78,85-89).

CYP11A1 mutasyonlarının neden olduğu P450cc eksikliğinde olguların klinik bulguları StAR mutasyonlarına bağlı LKAH tablosu ileörtüşür (90). *StAR* ve *SF1* genleri normal olan LKAH tanılı bir olguda *de novo* heterozigot *CYP11A1* mutasyonunun saptanması hastalığın patogenezinde bu genin önemli rolünün olduğunu göstermiştir (91). Kolesterolun yan zincirini ayıran P450scc enzimi kolesterolün pregnolona dönüşünümde işlev görür (79). P450scc eksikliği aynı zamanda plasental progesteron sentezini inhibe ederek gebeliğin sonlanmasına neden olmaktadır (92,93). Klinik ve laboratuvar bulguları StAR eksikliğindeki tabloya benzese de, adrenal hiperplazinin olmaması ayırıcı tanı da önemli bulgudur (90). Sonuçta, bu grupta ayırıcı tanıda klinik, hormonal ve görüntüleme bulgularının yalnız başına yetersiz kaldığı, kesin tanıda moleküler sonuçların önemli olduğu bildirilmektedir (90).

Androstenedionun biyolojik aktif olan testosterona dönüşümünü kataliz eden 17βHSD-3 enzim eksikliği, ilk kez 1971 yılında Saez ve arkadaşları tarafından tanımlamıştır (94). OR kalıtılan *HSD17B3* geninin kodladığıenzim, testosteron sentez sürecindeki anahtar beş enzimden biridir ve sentezin son basamağındaki reaksiyonu katalize eder. 17βHSD-3 eksikliği testosteron biyosentez kusurlarının ek sık rastlanan tipidir (95). Sinecker tip 5'den (tamamen normal dişi görünüm), mikropenis ve hipospadiaslı erkeğe kadar geniş bir klinik yelpazede bulgu veren bu hastalıkta en sık görülen bulgular kliteromegali ve/veya kör vajinadır (96). Enzim eksikliğinde tipik

hormonal bulgu, artmış Androstenodion ve düşük Testeron seviyeleridir. DHT seviyeleri erişkin hastalarda düşük veya normal değerlerde olsa da, DHEA genellikle artmıştır. Bebeklerde bazal T/A oranının 0,8'den küçük olması ayırıcı tanıda önemli bulgudur (96). Müller yapılarının yokluğu ve Wolf yapılarının normal gözlenmesi 5-alfa redüktaz eksikliği olgularında da görüldüğü için patognomik bulgu değildir (97). Gonad dokusunun histolojik incelenmesinde normal testisküler yapılar görülse de spermatogenez izlenmez ve bu olgular infertildir (96). Olgularda germ hücreli malignite riski yüksek olduğundan (%28), erkek cinsiyetle yetiştirilen ve gonadektomi yapılmayan olguların malinite açısından takibi önemlidir (96).

2.2.3.4. Elektron Transferinin Bozulması Sonucu Etkilenmiş Steroidogeneze Bağlı 46,XY CGB

Elektron donör proteinlerinin hasarı sonucu steroid sentezinin etkilenmesinin iki tipi tanımlanmıştır: sitokrom P450 oksidoredüktaz (POR) ve sitokrom b5 eksikliği

POR eksikliği, *CYP17A1* ve *CYP21A2* enzim eksikliklerinin birlikte görüldüğü olgulara benzer endokrin bulgular gösterir (98). Moleküler analizlerde bu genlerde mutasyon saptanmayan olgularda aday gen çalışmaları *POR* geni üzerine yoğunlaşmıştır (99). *POR* geni çalışmaları, p.A287P ve p.R257H mutasyonlarının bu gen ile ilişkili tanımlanmış mutasyonların yaklaşık %50'sini oluşturduğu, bu mutasyonlardan ilkinin proteinin FAD (flavin adenin dinükleotit) bağlanma, ikincisinin ise kofaktörle etkileşen domainini bozduğunu göstermiştir (100-102). P450 oksidoredüktaz 82 kDa ağırlığında olup tüm mikrozomal P450 grubu enzimler (17 hidroksilaz,17-20 liyaz, aromataz, 21-hidroksilaz steroidojenik enzimleri dahil) için elektron donörü olan bir flavoproteindir. P450 sistemi üç kısımdan oluşur: POR bölgesi, sitokrom P450 ve lipidler. POR'un biri NADPH (indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) bağlayan, diğeri FAD bağlayan iki farklı bölümü bulunmaktadır (103,104).

POR eksikliği görülen olgularda mineralokorktikoid üretimi normal düzeylerde iken, glukokortikoid ve seks steroidlerinin düzeyi mutasyonun tipine bağlı olarak değişik düzeylerde etkilenir (100). Etkilenen dişi olgularda androjen düzeylerinin düşük olmasına karşın virilizasyon görülür. Pubertede primer amenore gözlenebilir. Bu olgularda over kistleri daha sık olarak gözlemlenmesinin nedeni primer hipogonadizm ve anovulasyonun olmasıdır (105). POR eksikliği olan erkek olgularda yetersiz maskülinizasyona bağlı mikropenisten ağır hipospadiasa kadar geniş spektrumda

fenotip gözlenir. Erkek olgularda dişilere kıyasla pubertenin spontan olarak ilerlediği gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin ise testiküler 17,20 liyazın aktivasyonunda POR'un etkinliğinin overlerdeki kadar önemli role sahip olmadığı varsayılmaktadır (105). Yapılan çalışmalarla bu görevi kısmen de olsa sitokrom b5'nin üstlendiği, daha ağır *POR* mutasyonlarında ise genital anomalilere iskelet anomalilerinin (ulna ve femurda eğrilik, kamptodaktili, kraniyosinostozlar vb) de eşlik ettiği (örn; Antley Bixler sendromu) bildirilmiştir (106).

POR olgularında hCG uyarı sonrası yetersiz testosteron cevabı, adrenal androjenlerinin düzeyinde artış, yüksek 17-OHP, ACTH uyarısı sonrası yetersiz kortizol cevabı ve idrar steroid analizinde artmış pregnenolon ve metabolitleri görülür (107).

Sitokrom b5 kusuruna bağlı 46,XY CGB herediter tip IV methemoglobinemi bir olguda gösterilmiş ve olgunun 46,XY CGB'sinin moleküler etiyopatogenezinde, adrenal steroidogenezinde 17α hidroksilasyonunda sitokrom b5'nin elektron donorü görevini üstlendiği ve bu gendeki mutasyonun hastalık ilişkili olduğu gösterilmiştir (58).

2.2.3.5. Testosteron Metabolizması Bozukluğuna Bağlı 46,XY CGB. Steroid 5-α Redüktaz Enzim Eksikliği

Androjenik aktivite için başlıca androjenler testosteron (T) ve 5α - dihidrotestosterondur (DHT). Erkek dış genital yapısının şekillenmesinde, androjen duyarlı dokuların oluşumunda önemli olan DHT'nin sentezi ve işlevidir, bu dönüşümü katalizleyen anahtar enzim ise 5-α redüktaz tip 2 (*SRD5A2*)'dir. DHT'nin daha etkin olması, reseptöre güçlü bağlanması ve daha uzun süre stabil kalması ile sağlanır. Bu enzimin eksikliğine bağlı ortaya çıkan pubertede virilizasyonla sonuçlanan cinsiyet gelişim bozukluğu fenotipi ilk kez 1974 yılında McGinley ve ark. tarafından tanımlanmıştır (108-110). *SRD5A2* prostat, epididim, uterus, meme ve testislerde eksprese olur. Enzimin, Testosteron ve NADPH-kofaktör bağlayan iki önemli bölgesi bulunur. Enzim bozukluğu olan olguların hormonal bulguları normal veya artmış T düzeyi, azalmış DHT düzeyi ve hCG uyarısı sonrası artmış T/DHT oranıdır. Fenotipik olarak benzer olduğu androjen duyarsızlığı sendromlarında da serum androjen düzeyleri artmıştır. Olguların genital muayenesinde kuşkulu genital yapıdan, mikropenis, bifid skrotum ve hipospadiasa kadar geniş spektrum gözlenir. Bazı olgularda kliteromegalili dişi görünümü de olabilir. AMH sentezi normal olduğu için mülleryen yapılar

gerilemiştir (111). Çalışmalar bu gende 100'ün üzerinde homozigot veya birleşik heterozigot formda farklı mutasyon (yanlış anlamlı, anlamsız, kırpılma bölgesini etkileyen, büyük gen delesyonları) bildirilmiştir(112).

2.2.3.6. Androjen İşlevindeki Bozukluklara Bağlı 46,XY CGB. Androjen Duyarsızlık Sendromları

Androjen Duyarsızlık Sendromları (ADS), değişik derecede virilizasyon ile yetersiz maskülinizasyon ve periferde androjen direnci ile karakterize ve X'e bağlı kalıtım gösteren, 46,XY cinsel gelişim bozukluklarının en sık nedeni olan hastalık grubudur (113). Doğum insidansı 1/20,000-64,000 olan sendrom, ilk kez Morris tarafından 1953'de tanımlanmıştır (114). Farede X'e bağlı testiküler feminizasyondan sorumlu genin varlığı Lyon ve Hawkes tarafından 1970 yılında ileri sürülmüştür. Bu genin (Androjen reseptör geni - *AR*) insandaki lokalizasyonu ve hastalık ilişkili mutasyonları ilk kez 1989'da Brown ve ark. tarafından tanımlamıştır (115,116). Xq11.12'de lokalize olan *AR* geni 90 kb büyüklüğündedir. *AR* mutasyonları olguların yaklaşık %70'inde X'e bağlı resesif kalıtım gösterirken, %30'unda mutasyonların *de novo* oluştuğu bildirilmektedir (117). AR proteini, transaktivasyon bölgesi (NH_2 - terminal bölge), DNA bağlanma bölgesi, hinge (menteşe) bölgesi ve ligand bağlanma bölgelerinden oluşmaktadır (118). N-terminal bölgesinde poliglutamin ve poliglisin tekrar bölgesi yer almaktadır. Bu tekrar bölgesinin patojenik varyantlarının nörolojik ve/veya endokrin anomalilerle (Spinal ve bulbar muskular atrofi/Kennedy hastalığı) ilişkisi saptanmıştır (119). ADS'ler, *AR* geninin tam fonksiyon kaybı (komplet ADS), kısmi fonksiyon kaybı (parsiyel ADS) veya transkripsiyonda görevli ko-aktivatör protein bozuklukları sonucu oluşmaktadır (120-123) (Tablo 2-4).

Tablo 2-4. ADS'lerin sınıflandırılması (113).

Tip	Dış Genital yapı	Bulgular	*AR* mutasyon frekansı (dizi ile saptanabilen)
Tam Androjen Duyarsızlığı (CAIS)	Dişi (testiküler feminizan)	Wolf kanal gelişmemiş ya da yok Vas deferans var/yok Kısa kör vajina Pubik ve kol altında seyrek kıl	% 65-95
Kısmi Androjen Duyarsızlığı	Dişi ya da şüpheli	Inguinal ya da labial testis Klitoromegali ve labiyal fuzyon	< % 50

(PAIS)		Ürogenital sinus	
	Şüpheli	Mikrofallus İnmiş ya da inmemiş testis Urogenital sinus Pubertede jinekomasti	
	Erkek	Normal penis boyu, izole hipospadias İnmiş testis *veya* Mikropenis, Ağır hipospadias, Bifid skrotum İnmiş ya da inmemiş testis	
Yetersiz virilize erkek (MAIS)	Erkek	Spermatogenez yetersizliği Pubertede jinekomasti	Bilinmiyor

Komplet ADS'lerde dış genital yapı dişi görünümde olup, kısa ve kör sonlanan vajen mevcuttur. Wolf yapıları ve prostatları yoktur. Pubik kıllanmanın geç başladığı ve seyrek olduğu, aksiller kıllanmanın ise görülmediği bu olgularda Müller yapıları nadiren gözlenir (124).

Daha sık görülen parsiyel ADS olgularının bazılarında hafif kliteromegali ile dişi görünüm, bazılarında ise mikropenis, perineal hipospadias, bifid skrotum ve kriptorşidizmle kuşkulu erkek fenotipi olabilir, testisler inguinal kanalda veya labioskrotal kıvrımlar içinde yerleşim gösterebilirler. Testislerde Leydig hücreleri normal, spermatogenez ise bozuktur, prostat gelişimi yetersizdir. Pubertede meme gelişimi gözlense de, pubik ve aksiller kıllanma normaldir (124,125).

Hafif (Minimal) ADS'lerde koronal hipospadias, jinekomasti, tiz ses, seyrek pubik kıllanma ve impotans görülür. Bu olgularda testosteron düzeyi normal, anormal LH yüksekliği ve oligospermi görülür (124).

Bu grubun testosteron sentez bozukluklarından farklı yönü, T ve DHT düzeylerinin normal veya yüksek olmasıdır. Postnatal ilk 3 ayda (mini - puberte) döneminde yenidoğanda bazal LH ve T değerlerinde artış olur. Puberte öncesi dönemde T salgılama kapasitesinin bazal değerleri değil, hCG uyarısı sonrası ölçülen T ve DHT değerleri anlamlıdır. ADS'lerde uyarı sonrası cevap yeterli düzeydedir. Uyarıya yeterli T yanıtının olması sentez kusurlarını, normal DHT yanıtı ise steroid 5-α redüktaz eksikliğini dışlamaktadır (125). T/DHT oranı >10 olan olgularda *SRD5A2,* mutasyon saptanmazsa *AR,* T/DHT oranı <10 olan olgularda ise *AR*, mutasyon saptanmadığı durumda ise *SRD5A2* incelenmektedir. Komplet ADS'li olgulardan ayırt edilmesi zor olan grup 46,XY kısmi gonadal disgenezili olgulardır.

2.2.3.7. Diğer Nedenler

AMH yapım ve etki kusurları, izole hipospadias, kriptorşidizm ve cinsiyet anomalilerinin eşlik ettiği sendromlar diğer nedenlerdir.

2.2.4. 46,XX CGB

46,XX CGB erkek fenotipinde olan bireyin kromozom kuruluşunun 46,XX olmasıyla karakterizedir, testiküler CGB olarak da adlandırılır ve ilk kez 1964 yılında tanımlanmıştır (126,127).

2.2.4.1. Gonadal Disgenezilerin Neden Olduğu 46,XX CGB

46, XX erkek CGB olgularının %80-95'inde *SRY* varlığı FISH ve kromozomal mikroarray teknikleri ile gösterilmiştir (128). *SRY* pozitif olgularda iç genital yapı tümüyle erkek fenotipinde iken, negatif olgularda over ya da ovotestiküler yapıda olabilir. Non-sendromik 46,XX testiküler CGB'li olguların yaklaşık %15'de doğumda şüpheli genitalya mevcuttur. 46, XX erkek olgularının büyük çoğunluğu fenotip olarak erkek görünümde olup, olguların yaklaşık %85'de puberte sonrası pubik kıllanma ve penis boyu normalken, testisler küçüktür (129). Testislerin küçük olması ve azosperminin görülmesi ortak özellikleridir. Olgularda jinekomasti sıklığı yüksektir. Klinik ve laboratuvar bulguları Klinefelter sendromu ile benzer olsa da boyları dişi normal boy aralıkları ile uyumlu saptanmıştır. Hormonal bulguları testiküler bozukluğa sekonder gelişen hipergonadotropik hipogonadizm ile uyumludur. LH ve FSH bazal serum değerleri hafif yüksek, serum testosteron değerleri genellikle düşüktür. hCG uyarı sonrası bu olgularda düşük veya subnormal T cevabı gözlenir. Patolojik

incelemelerde, testis dokusunda fibroskleroz, seminefer tübüllerin sayıca azalması ve boyutlarında küçülme, germ hücrelerin yokluğu ve Leydig hücrelerinin hiperplazisi bildirilmiştir. Bu olgularda over yapıları izlenmemiştir (130).

Moleküler analizlerle bu grupta *SRY, SOX9* geninin promotor bölgesinde küçük duplikasyonlar veya triplikasyonlar, 17q24,3 bölgesini de içeren dengeli translokasyonlar ve *SOX9* geninin tümünü kapsayan duplikasyonları (mozaik veya non-mozaik), *SOX3* geninin upstream bölgesindeki mikrodelesyonlar veya mikroduplikasyonlar ve *RSPO2* vb genlerdeki mutasyonlar bildirilmiştir (131-136).

2.2.4.2. Androjen Sentez Bozukluklarına bağlı 46,XX CGB. Konjenital Adrenal Hiperplazi

Androjen fazlalığı fetal, fetoplasental ve maternal kaynaklara bağlı olabilir. Genellikle olgular normal over ve Müller yapılarının yanında dış genital yapının değişik derecede maskülinizasyonu ile belirir. Dişi fetus 12-14.haftadan sonra androjen etkisi altında kalmışsa sadece kliteromegali, 8-14.haftalar arasında androjen etkisine maruz kalmışsa ise klitorisin penis benzeri büyümesine, labiyumların tamamen birleşerek skrotum görüntüsü almasına ve klitorisin tepesinde tek ürogenital sinüsün olmasına neden olmaktadır. Bu olguların çoğu erkek olarak yetiştirilmekte ve bilateral kriptorşidizm ile başvurmaktadırlar (4).

Konjenital Adrenal Hiperplazi (KAH) adrenal kortekste, kolesterolden kortizol biyosentezini gerçekleştiren beş enzimden birinin eksik ya da hiç olmaması ile karakterize, kronik ACTH yüksekliği nedeniyle adrenal korteksin aşırı stimülasyonu ve hiperplazisi ile karakterizedir. Bu grubun %90'ı *CYP21A2'*e , %5'i *CYP11B1*'e, diğer kısım ise *CYP17A1, CYP11A1* ve *HSD3B2*'ye bağlı mutasyonlar sonucu oluşur (137) (Tablo 2-5). OR kalıtım grubunda en sık gözlenen konjenital metabolik hastalıklardan biridir.

Tablo 2-5. KAH'a neden olan enzim eksiklikleri (137)

KAH (%)	Eksik enzim	Substartı	Ürünü	Androjen	Mineralokortikoid
?	STAR	-	Mitokondriyal membrandan kolesterol transportunu sağlar	Eksik[1]	Eksik[2]
?	3β-HSD	Pregnenolon, 17-OH pregrenolon, DHEA	Progesteron, 17-OHP, Δ^4-androstenedion	Eksik[1]	Eksik[2]
?	17α-hidroksilaz	Pregnenolon Progesteron	17-OH pregnenolon 17-OH (17-OHP)	Eksik[1]	Fazla[3]
> % 90	**21-hidroksilaz**	Progesteron 17-hidroksi progesteron	DOC 11-deoksisterol	Fazla[4]	Eksik[2]
% 5	**11β-hidroksilaz**	DOC	Kortikosteron	Fazla[4]	Fazla[3]

[1]Erkek yenidoğanda virilizasyon yetersizliği, [2]Tuz kaybettiren tip, [3]Hipertansiyon görülür, [4]Dişi yenidoğanda virilizasyon

Klinik fenotip ağırdan hafife doğru çeşitli formlarda gözlenmesine ve enzim aktivitesinin derecesine göre iki tipi vardır: klasik ve non-klasik form(137).

Klasik form 1:7.000-15.000 sıklıkta olup, olguların %75'inde tuz kaybettiren, %25'inde ise basit virilizan tipi görülür. Tuz kaybettiren tip olgularda kortizol ve aldosteron sentezi yoktur, aldosteron/plazma renin aktivite oranı düşüktür ve renal tuz/sıvı kaybına bağlı letalite gözlenebilir. Basit virilizan tip olgularında ise hafif aldosteron sentezi vardır (rezidüel enzim aktivitesi), yenidoğan dişide dış genitalyada virilizasyon, erkekde erken puberte ve kısa erişkin boyu, dişide yalancı hermafroditizm görülür (137-140).

Non-klasik form 1:500-1.000 sıklıkta olup, hastalık bulguları ileri çocukluk yaşlarında başlamaktadır. Dişi olgularda hirşutizm, akne, erkek tipi kellik, menstral

gecikme ve düzensizlik, infertilite, polikistik over (PKOS) görülürken, erkek olgulardaerken dönemde bıyık, akne gözlenir. Sperm sayısı normaldir (137,141-145).

CYP21A2 gen bölgesinin yakınında (~ 30kb) psödogeni (*CYP21A1P)* vardır ve *CYP21A2* ile *CYP21A1P* genlerinin ekzonları % 98, intronları % 96 dizi benzerliği gösterir. Bu benzerlik *CYP21A2* gen analizini güçleştirir. Ayrıca, bu iki gen arasında, HLA bölgesinin yapısından kaynaklanan (bir çok tekrarlayan duplike genlerin varlığı nedeniyle) bir çok mikro ve makro rekombinasyonlar oluşmaktadır. Homolog kromozomlar arasında yanlış eşleşme ve eşit olmayan parça değişimi (*unequal cross over*) nedeniyle *CYP21A2* de büyük gen delesyonu ve gen konversiyonu oluşur. Bu durum, aktif *CYP21A2* genindeki mutasyonların büyük bir çoğunluğunun psödogen kaynaklı (% 85) olmasına yol açar (146-149). *CYP21A2* geninde hastalık ilişkili >300 mutasyon tanımlanmıştır (150). Gen delesyonu ve büyük 5' gen konversiyonu ile birlikte ~12 adet mutasyon (p.Gly111Valfs*21, p.Ile237Asn, p.Val238Glu, p.Met240Lys, p.Leu308Phefs*6, p.Gln319*, p.Arg357*, c.293-13A>G, p.Ile173Asn, p.Pro31Leu, p.Val282Leu, p.Pro454Ser) olguların % 95'inden sorumludur (151). Mutasyonların yaklaşık %70-80'i dizi analizi ve %20-30'u MLPA (delesyon/duplikasyon) analizi ile saptanır (137).

Plasental-fetal aromataz eksikliği nadir görülen OR kalıtılan hastalıktır. Anne ve fetusun adrenal bezlerinden salgılanan DHEAS öncelikle 3β-HSD ve 17β-HSD enzimleri ile androstenediona ve testosterona, sonrasında ise aromataz enzimi ile estradiole ve estrona dönüşmektedir (96). Plasental aromataz eksikliğinde anne ve fetusta maskülinizasyon ortaya çıkmakta ve KAH olgularından ayırıcı tanıda annenin gebelikte virilizasyon bulgusu ile ayrılmaktadır (152).

Maternal kaynaklı androjen fazlalığına ise annenin gebelik süresince kullandığı ilaçlar (progestasyonel, endometriyozisin tedavisinde kullanılan danazol ve stilbestrol vb) ve androjen salgılayan adrenal - over tümörler, gebelik lüteoması neden olmaktadır (153).

2.2.5. CGB'de Klinik Tanı

Kuşkulu dış genitalyası olan bebeğin doğumdan sonra dikkatle değerlendirilmesi, öncelikle ayrıntılı öykünün alınması, akraba evliliği, ailede perinatal-neonatal ölümlerin varlığı, puberte ve menarş gecikmesi, infertilite, kriptorşidizm, hipospadias, mikropenis veya kuşkulu genital yapılı bireylerin varlığı, gebelik süresince

annenin aldığı ilaçlar, maskülinizasyonun olup olmadığı sorgulanmalıdır. Belirgin kuşkulu genital yapı dışında CGB düşündürecek durumlar, kliteromegali, labiyal adhezyonlar, inguinal-labiyal kitle varlığı, erkeklerde nonpalpabl testis, mikropenis, karyotip ile genital görünüş arasındaki uyumsuzluklardır. Yenidoğan döneminde çoğu olgu tanı alsada, ileri yaşlarda dişide inguinal herni varlığı, pubertenin gecikmesi veya inkomplet puberte, primer amenore; erkekte jinekomasti, tekrarlayan ciddi hematüri tanıda CGB düşündürmelidir (154).

Fizik muayenede gergin durumda fallusun boyu, labiyoskrotal füzyonun durumu ve gonadların durumu değerlendirilmektedir. İnguinal ve skrotal bölgede palpe edilen gonad testisin mevcut olduğunu göstermektedir. Yenidoğanda klitorisin boyu 1 cm'den kısa, penis boyu ise 2.5 cm'den büyüktür. Klitoris gebeliğin 27.haftasında maksimum büyüklüğüne eriştiği halde, penis doğuma kadar büyür (154). Genital bölgedeki hiperpigmentasyon, ishal, kusma ve dehidratasyon KAH olgularında sık görülmektedir. Gonadlar bilateral olarak palpe edilemiyorsa ilk olarak ayırıcı tanıda 21-hidroksilaz eksikliğine bağlı KAH düşünülmekte ve plasental steroidlerle karışımı önlemek amacıyla 24-48 saatlerde 17-hidroksiprogesteron (17-OHP) düzeyi ölçülmektedir. Olgularda hiponatremi, hiperpotasemi ve plazma renin aktivitesindeki artış tuz kaybını göstermektedir (154,155). Normal erkek yenidoğanda doğumu izleyen 1-2.haftalarda serum gonadotropin ve testosteron düzeyleri artar ve 3-6. ayda düşer, bu nedenle de ilk aylarda serum testosteron düzeyinin değerlendirilmesi Leydig hücre işlevi açısından bilgi vericidir. 6. aydan sonra ise serum testosteron düzeylerinin inmesi ile tanıda hCG uyarısı sonrasındaki testosteron yanıtı önem kazanmaktadır. AMH ve inhibin-B ölçümü Sertoli hücre işlevi açısından yaralı belirteçtir. AMH, tam gonad disgenezi ve AMH gen mutasyonlarına bağlı Müller kanal sendromlarında saptanamaz düzeylerde, testosteron sentez kusurlarında normal, androjen duyarsızlığı olan olgularda ise yüksek bulunmaktadır. 46,XY olgularında hCG uyarısına testosteron yanıtı, gerekli olduğunda prekürsörler ve dihidrotestosteron düzeyleri de ölçülmektedir. Bazal LH ve FSH düzeylerinin artışı işlevsel olmayan gonadın varlığını göstermektedir (154-156). Pelvis ve abdominal USG ve gerek olduğu durumlarda manyetik rezonans görüntüleme teknikleri ile gonadların ve Müller yapılarının varlığı araştırılmalı, ancak bu tekniklerinin de duyarlılıklarının düşük olduğu bilinmelidir (155,157).

2.2.5.1. CGB'lerde Genital Yapı Skorlamaları

46,XY CGB, ADS'lerde dış genital evreleme (158)'den

Evre 1: Normal erkek görünümü

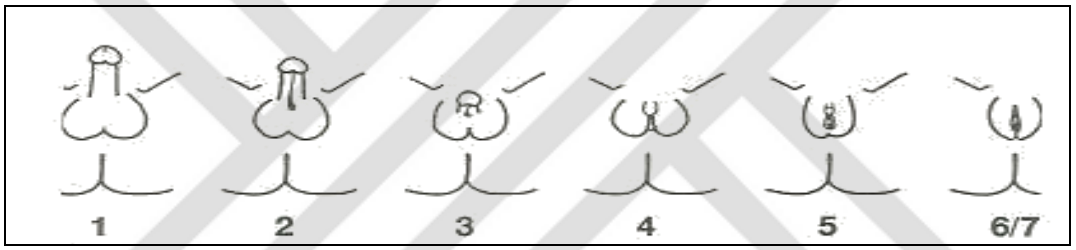
Evre 2: Erkek görünümünde, fakat hafif derecede hipospadias var.

Evre 3: Ağır derecede maskülinizasyon kusuru var - mikropenis, penoskrotal hipospadias, bifid skrotum ve/veya kriptorşidi

Evre 4: Ağır derecede şüpheli genital yapı-klitorise benzeyen fallus, labioskrotal kıvrım, tek delik.

Evre 5: Posterior labial yapışıklık ve kliteromegalisi olan kız görünümü.

Evre 6/7:Tam kız görünümü (erişkinde pubik kıllanma mevcutsa→ Evre 6, kıllanma yoksa → Evre 7).



Şekil 2-5. ADS'lerde dış genital evreleme.

46,XX CGB'lerde Prader evrelemesi (159)'dan

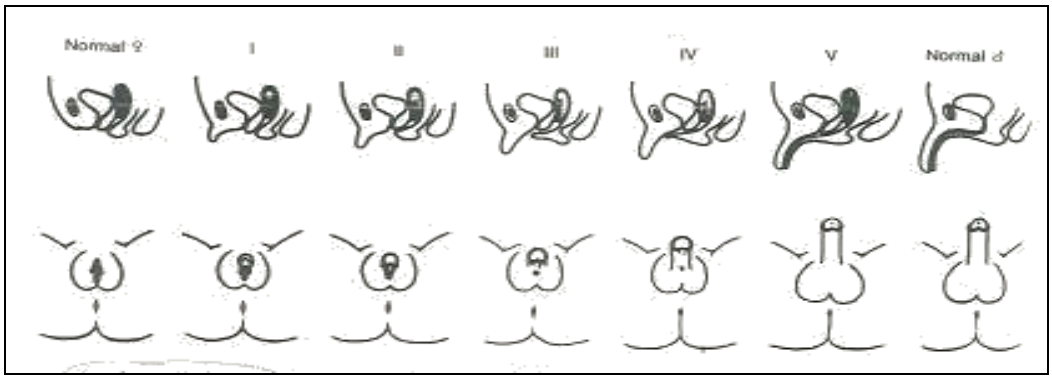
Evre I: Kliteromegali.

Evre II: Kliteromegali ve parsiyel labiaskrotal füzyon.

Evre III: Kliteromegali, labioskrotal yapışıklık füzyon ve tek delik (Ürogenital sinüs)

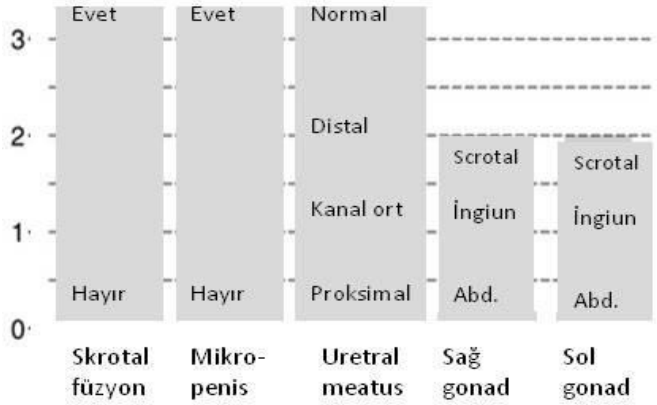
Evre IV: Büyük fallus ve tabanında ufak ürogenital sinüs.

Evre V: Erkeğe benzer görünüm, üretra ağzı glans ucunda



Şekil 2-6. Prader evrelemesi.

Eksternal Maskülinizasyon Skoru (EMS) (157)'den



	Evet -Puan	**Hayır-Puan**
Labioskrotal füzyon	3	0
Mikropenis	0	3
Urogenital açıklık	Proksimal : 0 Orta penil : 1 Distal : 2 Normal: 3	
Sağ gonad	Palpe edilmiyor :0 Inguinal :1 Skrotal :1,5	
Sol gonad	Palpe edilmiyor :0 Inguinal :1 Skrotal :1,5	
Toplam Puan		

(Maksimum EMS skor 12 ve Normal)

İnternal Maskülinizasyon Skoru (IMS) (157)'den

	Evet-Puan	**Hayır-Puan**
Uterus	0	3
Fallopian tüp (sağ)	0	2
Fallopian tüp (sol)	0	2
Epididim (sağ)	2	0
Epididim (sol)	2	0
Vas deferens (sağ)	2	0
Vas deferens (sol)		
Toplam Puan		

(Maksimum IMS skor 10)

2.3. Moleküler Yöntemler

2.3.1. DNA Dizileme Yöntemleri

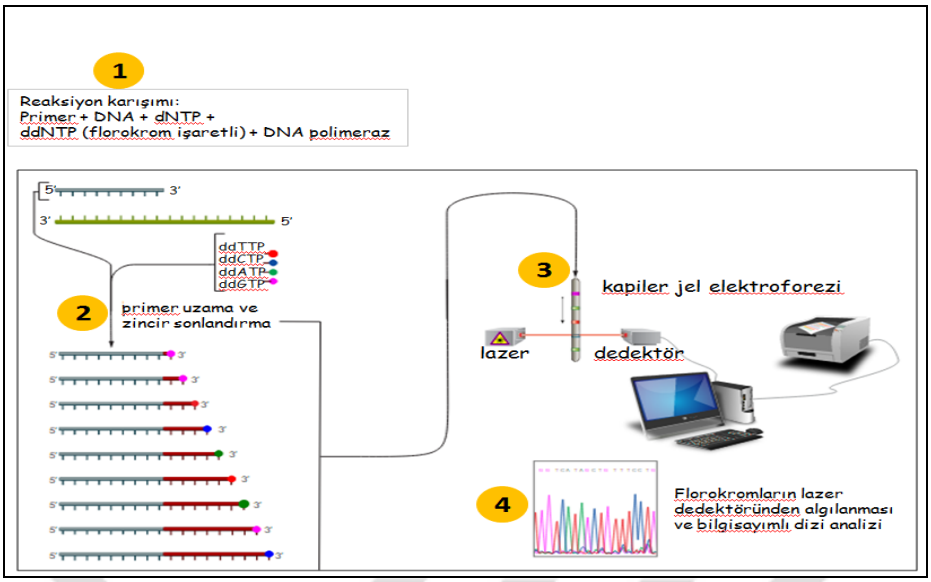
Rekombinant DNA tekniklerinin gelişmesi ve DNA dizi analizinin keşfi genomun yapısını ve genetik kontrol mekanizmalarının aydınlatılmasını sağlamıştır. DNA dizi analizi çalışmalarının tarihsel süreci, 1965 yılında R. Holley'in 74 nükleotidlik tRNA molekülünü dizilemesiyle başlamış, daha sonra 1977'de A. Maxam ve W. Gilbert'in iki farklı DNA dizi analiz yöntemini geliştirmeleri ile devam etmiştir. 1982'de A. Wada, DNA dizi analizinin otomatize edilmesini önermiş, 1986 yılında Kalifornia Teknoloji Enstitüsü'nden (Caltech) L. Hodd ve L. Smith tarafından her bir DNA bazının farklı florofor ile işaretlenmesi ve poliakrilamid jel elektroforezi sırasında detektör vasıtasıyla florofor işaretli bazların saptanması temelli yöntem ile tam otomatik bir makine geliştirilmiştir. 1992 yılında 21. kromozomun DNA dizi analizi tamamlanmıştır. C. Venter, C. Fraser ve H. Smith 1995 yılında *Haemophilus influenzea*'ya, 1996 yılında *S. Cerevisiae*'ya ait DNA dizisini yayınlamıştır. 1998'de Sanger Center ve Washington Üniversitesi, *Caenorhabditis elegans*'ın DNA dizisini yayınlamışlardır. 1999 yılında insan 22. kromozomunun DNA dizisinin okunması tamamlanmıştır. Celera ve ortak çalıştıkları kurumlar 2000 yılında *Drosophila melanogaster*'in DNA dizisini yayınlamışlar ve aynı yıl Haziran ayında insan genom projesinin (IGP) ve insan gen haritası taslağının tamamlandığı açıklanmıştır, ayrıca aynı yıl *Arabidopsis thaliana*, DNA dizisi açıklanan ilk bitki olmuştur. 2003 yılında ise Y kromozomunun dizi analizi tamamlanmıştır (160).

İnsan Genom Projesinin ardından genomun yapısını, fonksiyonunu, çeşitliliğini ve regülasyonunu daha iyi anlayabilmek için başlatılan ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) ve HapMap gibi projeler ile canlı genomunun organizasyonunu, fonksiyonunu ve genom dizilimini belirleme de uzun yıllardan beri kullanılmakta olan

Sanger dizileme yönteminin, süre, emek, maliyet ve etkinlik açısından yetkin olmadığı, çok daha hızlı ve yüksek çıktılı dizileme yöntemlerine ihtiyaç duyulduğu anlaşılmıştır (161). Dizileme çalışmalarında her klonun ayrı ayrı amplifiye edilmesi ve dizilenmesi gerektiği için, tüm insan genomunun tamamlanması 10 yıldan fazla sürmüştür. Bu nedenle ikinci nesil dizileme ya da yeni nesil dizileme (YND) olarak adlandırılan yüksel kapasiteli paralel dizileme yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. YND teknolojileri ve eşlik eden fonksiyon analizleri çeşitli hastalıkların daha önce bilinmeyen yeni genetik temellerinin saptanmasına imkan sağlayarak genetik tanı için çeşitli yaklaşımların ortaya çıkmasına ve özellikle de panel gen testlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (162,163).

2.3.1.1. Sanger Dizileme

1977 yılında Maxam ve Gilbert tarafından kimyasal kırma ve Sanger ile ekibinin zincir sonlandırma metodunu keşfetmesiyle DNA dizileme çalışmaları ivme kazanmıştır. dideoksinükleotid (ddNTP) analogları ile DNA zincir uzamasının sonlandırılması esasına dayalı Sanger DNA dizileme yöntemi en çok kullanılan ve günümüzde de altın standart olarak kabul gören yöntemdir. Sanger yöntemi, zincir sonlanması esasına dayanır (164). Primer uzama aşamasında, normal nükleotidlere ek olarak floresan işaretli terminatör nükleotidlerin yeni sentezlenen zincire eklenmesiyle, her basamakta uzaması sonlanan fragmanlar elde edilir. Floresan işaretli ve farklı uzunluktaki zincirler, kapiller jel elektroforezinde uzunluklarına göre ayrılır ve taşıdıkları floresan sinyallerle ölçülür (Şekil 2-7). Yöntemin kapiler sistemlerin kullanıma girmesi ve bilgisayar sistemine entegre edilmesisayesinde, örneğin 96 kuyulu bir mikroplağın her bir kuyusuna konan farklı örneklerin aynı süreçte dizi reaksiyonuna girmesi ve elektroforetik ortamdan izlenerek dizilenmesi mümkün olmuştur. Bu sistemler her bir yürütmede, kullanılan primer yönünde, 500-600 bç uzunluğundaki DNA dizisini yüksek doğruluk oranlarıyla okuyabilmektedir.



Şekil 2-7. Sanger Dizileme'nin aşamaları.

2.3.1.2. Yeni Nesil Dizileme

Yeni Nesil Dizileme yöntemi, bir örnekten elde edilen DNA'nın milyonlarca fragmanının eş zamanlı olarak ve yüksek sayıda dizilenmesi esasına dayanan yöntemdir. İlk olarak 2005 yılında, 454 platformu *Life Sciences* tarafından, bir yıl sonra *Solexa* tarafından *Genome Analyser* ve *Agencourt* tarafından SOLID platformları piyasaya sürülmüş, daha sonra Agencourt, *Applied Biosystems* tarafından (2006); 454 Life Science *Roche* tarafından (2007) ve Solexa, *Illumina* tarafından satın alınmıştır (165). 2011 yılında ise Ion Torrent's PGM, Pacific Biosciences' RS (Pac Bio) veIllumina MiSeq yeni nesil dizileme platformları geliştirilmiştir.

Dizileme teknolojileri, genel olarak kalıp hazırlama, dizileme, görüntüleme ve veri analizi basamaklarından oluşur. Kalıp hazırlama aşamasında *tek DNA molekülünden klonal olarak çoğaltılmış* ve *tek DNA molekülü* olmak üzere iki yöntem kullanılır (166).

Klonal olarak çoğaltılmış kalıpların hazırlanmasında kullanılan en yaygın yöntemler *emülsiyon PZR* (emPZR) (167) ve *katı faz amplifikasyo*nudur (168). emPCR, dışı yağ içi PZR reaksiyonun gerçekleştiği reaktif sıvı olan mikroskopik boncukların her bir tanesinde tek tip bir primerin varlığı ile buna eşleşen kalıp DNA'nın klonal biçimde çoğaltılması yöntemidir. Katı faz amplifikasyonu da cam bir slayt üzerinde fragment veya komplementer kalıplardan elde edilen rastgele dağılmış ve klonal olarak çoğaltılmış kümelerin elde edilmesi temeline dayalıdır (169).

Tek molekül kalıplarında ise aşağıdaki yöntemler kullanılmaktadır:

- başlangıç materyalinin rastgele küçük parçalara (yaklaşık 200-250 bç) ayrılarak ortak adaptörlerin fragman sonlarına eklenmesiyle elde edilen kalıbın katı desteğe kovalent bağlı primer moleküllerine hibridizasyonu (*Helicos BioSciences*);

- tek iplikli tek-molekül kalıplarının immobilize primerler ile uzatılması ile bölgesel olarak dağıtılmış kalıpların katı desteğe kovalent olarak bağlanması (*Helicos BioSciences*)

- dağınık tekli polimeraz moleküllerinin katı desteğe tutturulması (*Pacific Biosciences*) olmak üzere üç farklı yaklaşım vardır (170).

Dizileme yöntemleri ise *geridönüşümlü zincir sonlanması*, *ligasyona dayalı*, *tek-nükleotit ekleme - pirodizileme* ve *gerçek-zamanlı dizileme* olmak üzere çeşitleri vardır (171). Farklı platformlar hem kalıp hazırlama hem de dizileme aşamasında farklı yöntemleri kullanmaktadır (Tablo 2-6).

Tablo 2-6. Dizileme platformlarının karşılaştırılması (172)'den alınmış ve yeniden düzenlenmiştir.

	1. Nesil Dizileme	**2. Nesil Dizileme**				**3. Nesil Dizileme**	
	Sanger	**FLX 454 GS (Roche)**	**Solexa (Illumina)**	**SOLID (Applied Biosystem)**	**Ion Torrent (Thermo Fisher)**	**Helicos (HeliScope)**	**PacBio (Pacific Bioscience)**
Kütüphane Oluşturma	Mekanik veya enzimatik fragmentasyon	Mekanik veya enzimatik fragmen-tasyon	Mekanik veya enzimatik fragmen-tasyon	Mekanik veya enzimatik fragmen-tasyon	Mekanik veya enzimatik fragmen-tasyon	Mekanik veya enzimatik fragmentasyon	Mekanik veya enzimatik fragmentasyon
Klonal Amplifikasyon	Klonlama, PZR	emPZR	Köprü PZR	emPZR	emPZR	**yok**	**yok**
Dizileme	Zincir sonlanması	Piro-dizileme	Geridönü-şümlü zincir sonlanması	Prob ligasyonu	Hidrojen iyonuna duyarlı yarı iletken	Gerçek zamanlı (Real-Time) dizileme	Gerçek zamanlı (Real-Time) dizileme

Yeni nesil dizileme ile elde edilen veriler kısa okuma uzunluklarına sahip olduklarından ileri biyoinformatik araçlarla bu dizilerin referans genoma haritalanması

ve ardışık birleştirilerek hizalanması gereklidir. Kısa okuma uzunlukları (~400bç) nedeniyle YND yöntemleri tekrar dizilerinin, büyük delesyon ve duplikasyonların net olarak belirlenmesini, dengeli translokasyonlarda kırık bölgelerin amplikon sınırları içinde bulunması durumuna bağlı olarak belirlenmesinde olanaklı değildir (173).Ayrıca YND sonucu elde edilen varyantların çokluğu ve onların anlamlandırılmasındaki zorluklar, ko-segregasyon analizleri, hedef bölgelerin motif veya GC baz içeriği açısından zengin olması kaynaklı düşük okuma alınan amplikonların yeniden taranması gerekliliği vb. uzun süreli ve ek masraf gerektiren işlemlerdir.

YND teknolojisindeki yeni gelişmeler temeli PZR'e dayalı olmayan üçüncü nesil dizileme teknolojilere doğru evrilmekte olup, daha kısa sürede veri eldesini sağlamanın yanı sıra PZR hatalarının önüne geçmeyi hedeflemektedir(174).

Üçüncü nesil dizileme veya tek-zincir molekül dizileme teknolojisi üç farklı kategoride incelenir: 1) *DNA polimeraz kullanılarak sentez yoluyla dizileme*, 2) *nanoporlardan yararlanarak dizileme* 3) *Direkt görüntüleme ile dizileme*. Daha yüksek verim, daha hızlı geri-dönüş, uzun okuma oranları, küçük miktarlarda başlangıç materyalinin yeterli olması gibi avantajları olan üçüncü nesil dizileme için günümüzde geliştirilen teknolojik yaklaşımlardan bazıları bunlardır: tek iplikli DNA molekülünün Gerçek-Zamanlı Dizilemesi *(Pacific Biosciences),* floresan rezonans enerji aktarımı kullanılan gerçek-zamanlı DNA Dizilemesi *(Visigen Biotechnology),* elektron mikroskopisi temelli dizileme *(Halcyon Molecular)*, taramalı-elektron mikroskobuna dayalı dizileme *(Reveo),* nanopor teknolojisi, tek zincirli DNA molekülünün doğrudan elektriksel algılanması *(Oxford Nanopor)*, optik okumalı nanopor teknolojisi ile dizileme ve transistor aracılı dizileme *(IBM)* (175-183).

YND, hedefli gen panelleri ile hastalık ilişkili birçok genin eşzamanlı dizilenmesi, tüm ekzom dizileme (TED) ve tüm genom dizilemeyi (TGD) ve ekpresyon çalışmaları için RNA dizileme ve metagenomik çalışmalar gibi çok çeşitli seviyelerde kullanılabilir. Genom dizileme yaklaşımlarından biri, genomun kodlamayan bölgeleri de dahil tüm genomun bütünüyle dizilendiği genomik bilginin en kapsamlı halini araştırmayı amaçlayan TGD, bir diğeri ise genin kodlayan ekzonlarını ve foksiyonel elementlerini hedefleyen (yaklaşık tüm genomun %1,5'i) ve genetik heterojenite gösteren nadir hastalıkların tanısında sıkça kullanılan TED yöntemidir (184). Her bir

yöntemin kendi sınırlamaları ve üstünlükleri, tercih edildiği durumlar vardır (Tablo 2-7).

Tablo 2-7. Yeni Nesil Dizleme uygulamalarının karşılaştırılması (185)'den alınmış ve yeniden düzenlenmiştir.

Dizileme Türü	Hedef bölgeler	Başlıca kullanım alanı	Kısıtlılıkları
Tüm genom dizileme	Tüm genler, tüm ekzonlar, tüm kodlamayan bölgeler	Hastalıkla ilişkili yeni genlerin keşfi	Fiyat Derinlik (coverage deep): düşük allel ayırımı için düşük duyarlılık
Tüm ekzom dizileme	Tüm genler, tüm ekzonlar	Klinik araştırma; tanısal test olarak; neo-epitop tahmini	Fiyat Derinlik (coverage deep): düşük allel ayırımı için orta derecede duyarlılık
Geniş gen panelleri	300–600 gen	Tanısal; klinik denemeler; klinik araştırma	Kapsam
Küçük gen panelleri	<100 gen	Tanısal;hastalık progresyonunun monitörizasyonu	Kapsam
***Hotspot* panel**	50–80 gen, spesifik ekzonlar, varyantlar	Tanısal	Kapsam
Transkriptom	mRNA	Varyant validasyonu; neo-epitop ifadesi; füzyon tespiti	Fiyat
Hedefli RNA paneli	Füzyon genleri	Füzyon tespiti	Kapsam; Varyant validasyon kapasitesi hedef bölgeye sınırlı

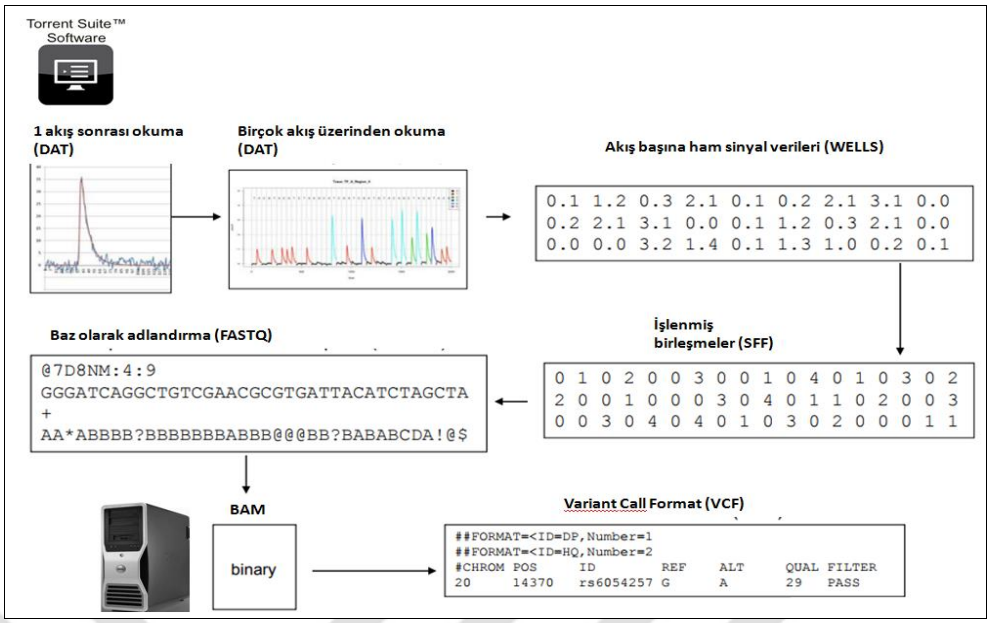
Gen panelleri sadece ilgilenilen hastalıkla ilgili genleri içerdiğinden hedefin tutarlı bir şekilde kapsanması (%99'a kadar) sağlanabilir (186). Bu yöntemle sadece hastalıkla ilişkili olduğu bilinen genlere odaklanıldığı için hedef daha fazla kapsamda ve okuma tekrarı ile taranır. Düşük okuma alınan bölgeler diğer alternatif moleküler yöntemlerle taranarak hedef tam kapsanılmış olur. Özellikle genetik heterojenite gösteren hastalık gruplarında gen panelleri daha düşük bir maliyetle dizilemeye olanak tanır (187-189).

Ion Torrent Platformu

Ion Torrent platformunda kütüphane ve taslak hazırlama aşamaları; DNA'nın multipleks primerlerle amplikon temelli çoğaltılması, elde edilen fragman uçlarının enzimatik olarak modifikasyonu (end repair) ve adaptörlerin bağlanması, adaptör bağlı kütüphane ürünlerinin emülsiyon PZR ile çoğaltılmasından oluşur. Uçlarına adaptör bağlı DNA fragmanları, üzerlerinde adaptör dizilerin tamamlayıcı bazlarından oluşan dizilerin kovalent olarak bağlı bulunduğu boncuklarla eşleştirilir ve içerisinde PZR için gerekli reaktiflerin ve polimerazın bulunduğu yağ mişelleri oluşturulurak her bir DNA fragmanı emPZR ile amplifiye edilir. Zenginleştirme aşamasında amlifiye edilmiş DNA fragmanlarını taşıyan boncuklar, yağ parçacıkları, reaktifler ve amplifikasyona katılmamış boncuklardan ayrıştırılır. Bu platformda altında iyon sinyal alıcısı bulunan milyonlarca kuyucuğa sahip çip üzerinde dizileme yapılmakta ve dizileme sırasında amplikonlara dNTP bağlandığı esnada ortaya salınan H^+ iyonlarını bu sinyal alıcısı algılayarak ham veriye dönüştürmektedir (190).

İş akışı sırasıyla, sinyal işleme, baz isimlendirme, haritalama, varyant isimlendirme-önceliklendirme ve yorumlanması basamaklarından oluşmaktadır. Bu basamaklar platformun Torrent Suite Server (TSS) olarak adlandırılan programı tarafından otomatik olarak gerçekleştirilmektedir. Varyant isimlendirme ve önceliklendirme TSS ile oluşturulmuş BAM ve BAM-BAI formatındaki verinin *Ion Torrent* platformunun *Ion Reporter* programı ile tekrar varyant isimlendirme, önceliklendirme ve ilişkilendirme ile birlikte ileri analize alınmaktadır.

Sinyal İşleme ve Baz İsimlendirme: Bu aşama sonrasında veri haritalanmamış BAM dosyası formatına dönüştürülmektedir (Şekil 2-8).



Şekil 2-8. *Ion Torrent* platformunda sinyal işleme ve baz isimlendirme.

Ham Verinin Kalite Kontrolü: Ham verinin adaptör kontaminasyonu, in-del ve düşük kaliteli okumalardan kaynaklanan yapay dizilerden arındırılması, standartlara uymayan okumaların çıkarılması veya düzeltilmesi aşamasıdır. Baz kalite değerlerinin ve nükleotid dağılımının görsellenmesini, primer kontaminasyonu, nükleotit içeriği ve GC fazlalığı gibi dizi özelliklerine göre okumaların filtrelenmesini içerir.

Haritalama ve Hizalama: Okumaların referans genomdaki lokalizasyonlarının belirlenmesi amacı ile haritalanıp hizalandığı basamaktır. FASTQ formatındaki diziler SAM/BAM uzantılı dosya formatına dönüştürülür. Veriler bam dosyası olarak saklanır. Platform bu aşama için TMAP (Torrent Mapping Alignment Program) algoritmasını kullanmaktadır.

Haritalama Sonrası Kalite Kontrolü: AQ17 (alignment quality 17): %2 ve daha düşük hata payı ile haritalanan baz sayısı, AQ20 (alignment quality 20): %1ve daha düşük hata payı ile haritalanan baz sayısı ve Perfect (mükemmel): hata payı olmayan olmak üzere üç formu vardır.

Varyant Belirleme, Filtreleme ve İsimlendirme: Hizalanmış dizilerin referans genomla kıyaslanarak varyasyonların belirlendiği basamaktır. İleri analiz aşamasında TSS tarafından üretilmiş BAM formatındaki referans genoma hizalanmış olarak saklanan veriler *Ion Reporter* programına aktarılır, *Ion Reporter* programı çalışma için belirlenmiş varyant isimlendirme ve analiz parametreleri ile varyantları belirleyerek

ilişkilendirme sonrası detaylı VCF raporu oluşturur. Varyantlar belirlendikten sonra IGV (*Integrated Genome Browser*) programında görüntülenebilir (190,191).

Tanımlanmamış varyantların analizinde *in silico* algoritmalar (Human Splice Finder, PolyPhen-2, SIFT/Provean ve MutationTaster) uygulanarak, tahminsel patojenite değerlendirilmesi yapılır (Tablo 2-9) (136-138).

Tablo 2-8. *In silico* analiz yazılımları.

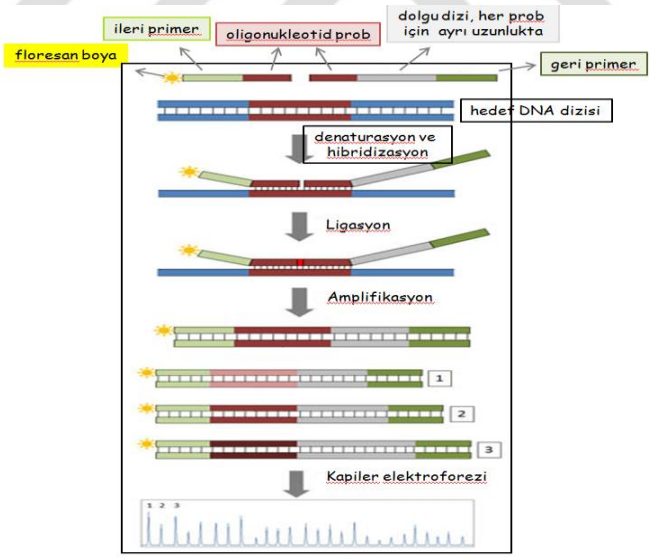
***In silico* tahmin programı**	**Geliştirildiği yıl ve geliştiren kişi/kurum**	**Skorlamanın dayanağı**	**Kaynak**
PolyPhen2	2010 (Shamil Sunyaev)	Dizi özellikleri (Uniprot anotasyonları), sübstitüsyonların yapısal etkileri ***HumDiv***, protein veri bankasında (UniProtKB) yer alan proteinleri kodlayan genlerde saptanan, Mendel hastalıkları ile ilişkilendirilmiş olan fonksiyonel olarak «zararlı» olduğu bilinen varyantları ve diğer memeli homologlarında «zararsız» olarak kabul gören varyantlar ile birlikte gruplaması ***HumVar,*** protein veri bankasında (UniProtKB) yer alan proteinleri kodlayan genlerde insanlardaki çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmiş «zararlı» varyantları ve MAF>%1 olan ve hastalıkla ilişkisi bildirilmemiş, «zararsız» varyantların gruplaması	Adzhubei ve ark. *Nat Methods*. 2010.
Sift	2009 (J. Craig Venter Inst.)	PSI-BLAST'tan homolog diziler arasındaki korunmuşluğun analizi	Kumar ve ark. *Nat Protocols*. 2009.
MutationTaster	2010 (Dominik Seelow)	Evrimsel korunmuşluk, kırpılma noktası değişimleri, poliadenilasyon sinyal dizi ve Kozak konsensus dizi değişimleri, protein anotasyonları (SwissProt)	Schwarz ve ark. *Nat Methods*. 2010.

2.3.2. MLPA (Multiple Ligation - dependent Probe Amplification)

MLPA, tek bir nükleotid değişimini dahi ayırt edebilen genomik DNA veya RNA dizisindeki 50'den fazla bölge için doz değişimlerini saptayabilen, aCGH ve SNP mikrodizin yöntemlerinin aksine basit, hızlı, düşük maliyetli, pratik bir teknik olarak genetik laboratuvarlarında geniş kullanım alanı bulan multipleks PZR'a dayalı bir tekniktir. Tekniğin sınırlamaları ise, nokta mutasyonlarının ve dengeli translokasyonları

saptanmasında yetersiz kalması, hedefe yönelik olup daha az çözünürlükte tarama yapması ve kontaminasyona açık olmasıdır (192).

Bir MLPA probu, hedefle eşleşen iki oligonükleotid zincirinden oluşur. Eğer örnek DNA içinde hedef dizi varsa iki prob bu DNA ya bağlanır. Hibridize olmuş probun iki parçası arasında fosfodiester bağı kurularak ligasyon ile birleştirilir. Ligasyonu tamamlanan prob multipleks PZR ile amplifiye edilir. Sadece hedef diziye bağlanabilen problar ligasyona uğrar ve PZR ile çoğaltılırlar. MLPA yönteminde klasik multipleks PZR'dan farklı olarak tek bir çift PCR primeri kullanılarak hedef bölgelerdeki diziler değil, hedef bölgeye hibridize olan MLPA probları amplifiye edilir (Şekil 2-8) (61). PZR sonrası her bir prob için hedef bölge ile orantılı özgün uzunlukta (130-500 nt) amplikonlar elde edilir. İleri primerde floresan boya varlığı nedeniyle kapiler elektroforez sonrası görüntüleme yapılabilir. Dolgu diziler her prob için farklı boydadır, böylece maksimum 50 farklı hedef aynı test tüpünde çoğaltılır ve birbirinden ayrılır. Örnekte DNA içindeki her bir hedef diziden elde edilen amplikonların miktarları karşılaştırılır ve veri analizi yapılır.



Şekil 2-9. MLPA tekniğinin basamakları ve reaksiyonda kullanılan probun özellikleri.

MLPA reaksiyonunda çalışılacak örneklerin kökeni, izolasyon yöntemi, DNA kalitesi (miktarı ve saflığı) ve referans örnek seçimi çok önemlidir ve sonuç kalitesini doğrudan ilgilendirmektedir. Çalışılacak örnek ve referans örnek (*her çalışmada en az üç olmak şartıyla*) aynı kökene sahip olmalı ve aynı yöntemle izole edilmelidir. İzolasyon sonrası DNA dilüsyonu için 10mM TE buffer kullanılması önerilmektedir ve EDTA konsantrasyonu 1 mM'den fazla olmamalıdır. Eğer EDTA konsantrasyonu fazla

olursa Mg^{+2} bağlanacağı için ligasyon ve PZR reaksiyonu olumsuz etkilenecektir. Tüm örneklerde benzer aralıkta DNA konsantrasyonunun olması ve saflık konusunda problem varsa örnekler alkol çöktürmesi ile ilave saflaştırma işlemine tabi tutulmalıdır. Saflaştırma sırasında glikojen kullanılması önerilmektedir (193).

MLPA yöntemi teknik hataların veri yorumlanmasındaki yanlışlıklara yolaçmaması için bazıiç kontrol mekanizmaları içermektedir. Prob karışımlarına bazı kontrol fragmanları; *4 adet DNA miktarı kontrol fragmanı* (Q-fragment)ve *3 adet DNA denatürasyon kontrol fragmanı* (D-fragment) eklenmiştir. Q-fragment olarak kullanılan 4 prob, 64, 70, 76 ve 82 baz uzunluğundadır ve amplifikasyonları ligasyondan bağımsız olarak gerçekleşir. Fragman analizi sırasında bu dört probun amplifikasyon ürünleri, D-fragment vediğer MLPA problarının amplifikasyon ürünleri ile karşılaştırılır ve Q-fragment amplifikasyonu diğerlerine göre daha fazla gerçekleşmişse, bu durum yaligasyonun gerçekleşmediğini, ya da örnekteki DNA miktarının yetersiz kaldığını gösterir. Buna karşılık D-fragment olarak karışıma eklenen 88, 92 ve 96 baz uzunluğundaki problar karışımdaki bütün diğer problar gibi ligasyona bağımlı olarak çoğalırlar ve bu probların amplifikasyon oranları, karışımdaki diğer MLPA probları gibi ligasyon başarılı olmuşsa, DNA miktarı yeterliyse ve kalıp uygun şekilde denatüre olduysa beklenen pik boyutunda gözlenirler. D-fragment olarak kullanılan problardan 92 baz uzunluğundaki prob, 2q14 lokalizasyonunda yer alan bir diziye, 88 baz uzunluğundaki fragman 6p21.3 bölgesindeki *FANCE* geninin upstream bölgesindeki CpG adacığına ve 96 baz uzunluğundaki fragman ise, 1p36 bölgesindeki *TP73* geninin upstream bölgesindeki CpG adacığına özgüdür. Son iki bölgenin yüksek oranda GC zengin olmaları denatürasyonlarını zorlaştırır. Bu fragmanların pik yüksekliklerinin 92 baz uzunluğundaki D-fragment vediğer problara göre %40 veya daha az bulunması, DNA örneğinin denatürasyonunun tam olmadığını göstermektedir. 92 baz uzunluğundaki prob, MLPA prob karışımına diğerlerinden daha az miktarda eklenir ve bu özelliği ile hibridizasyon kontrolü için kullanılır. Eğer bu proba özgü amplifikasyon ürünü 88 ve 96 baz uzunluğundakilere göre çok daha düşük boyutta ise, prob-hedef hibridizasyonunun yetersiz olduğu anlaşılır (193).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubumuzu, 1997 -2017 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Polikliniğe genetik konsültasyon amacıyla Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Çocuk Endokrinoloji BD polikliniğinden yönlendirilen klinik ya da ayırıcı tanıda non-sendromik CGB'nin yer aldığı 44 etkilenmiş olgu oluşturdu. Kromozom anomalisi dışlanmış olguların 22'sinde daha önce tanı amaçlı *AR* ve *SRD5A2* genleri Sanger dizileme yöntemi ile incelenmiş ve herhangi bir mutasyon saptanmamıştı. Bu 22 olgu ile yeni 22 olguda YND tabanlı panel-gen ve MLPA yöntemleri uygulandı ve bu tekniklerin moleküler genetik tanıya olan katkısı incelendi.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (21.10.2016 tarih ve 380079 sayı, ek-1). Çalışmaya katılan ailelerden aydınlatılmış onam alındı (ek-2).

3.2. Yöntemler

3.2.1. Klinik Değerlendirmeler

Olguların öykü, fizik ve laboratuar muayene bulguları ekte (ek-3) gösterilen muayene formu esas alınarak kaydedildi. Aile öykülerine göre aile ağaçları en az üç kuşak olmak üzere hazırlandı. Etkilenmiş bireylerin fotoğrafları, ek tetkikleri (pelvik, abdominal, gonadal ultrasonografi vd) ve laboratuar test sonuçları (endokrinolojik, sitogenetik ve daha önce yapılmış ise moleküler genetik testleri vd.) dosyalarına işlendi. Bu olgulardan herhangi bir kromozom anomalisi saptanmayanlar tez kapsamında değerlendirmeye alındı.

3.2.2. Moleküler Yöntemler

3.2.2.1. DNA Eldesi

DNA izolasyonları, steril 2 ml K_3EDTA'lı periferik venöz kan örneklerinden solüsyon/manyetik boncuk bazlı sistemle özgün kitler (*DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche11667327001/Magnapure Large Volume KIT, Roche03730972001 ve EZ1 DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Qiagen 951054*) kullanılarak, firma protokollerine uygun şekilde yapıldı.

3.2.2.2. DNA Kalite Değerlendirme, Seyreltme ve DNA Yoğunluğunun Ölçümü

İzolasyon sonrası çalışmaya alınacak DNA örneklerinin yoğunlukları (ng/µl) ve absorbsiyon ölçümleri ($A_{260/280}$~1,80 - 1,89) spektrofotometrede ölçülerek kayıt edildi (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific). $A_{260/280}$değerleri 1,80'den daha az olan örnekler protein kontaminasyonu nedeniyle manuel olarak tekrar çöktürülerek saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi aşamaları ise şöyle yapıldı; son konsantrasyonu 2mM Ammonium Asetat [$NH_4C_2H_3O_2$], 2.5 hacim %100 etanol [C_2H_5OH]ve %2'lik glikojen ile çöktürüldükten sonra, pellet 2 defa %80'lik ve bir defa %100'lük etanolde yıkandıktan sonra kurutularak, dH_2O veya TE'de çözüldü. $A_{260/280}$ değerleri 1.80-1.89'den fazla olan örnekler ise RNase enzimi ile muamele edilerek fazla olan ribonükleik asitler parçalandı. Her olgu için, DNA yoğunluğu 1,6-2.0 ng/µl olacak şekilde miliQ (18MΩ) su kullanılarak gerekli seyreltme işlemleri yapıldı. Final DNA yoğunluklarının yeni nesil dizileme tekniği için gerekli aralıkta (1,6 - 2 ng/µl) olması sağlandı.

Seyreltilmiş DNA örnekleri ölçülmeden önce kalibrasyon amaçlı Qubit dsDNA HS Assay Kit ile ölçüm yapıldı. Kalibrasyon ölçümü için kitin içeriğinde bulunan iki farklı standart örnek kullanıldı. Standart örnek başına 199 µl Qubit® dsDNA HS Buffer ve 1 µl Qubit® dsDNA HS Reagent kullanılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. On mikrolitre standart örnek 190 µl çalışma solüsyonu ile karıştırılarak 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra Qubit® 3.0 Florometrede ölçüm yapıldı. Kalibrasyon ölçümü sonrasında, her bir örnek için aynı şekilde hazırlanmış çalışma solüsyonu kullanılarak karışım (198 µl çalışma solüsyonu + 2 µl seyreltilmiş DNA örneği) hazırlandı. İki dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası ölçüm yapıldı. Örnek DNA, yoğunlukları istenen aralığa (1,6-2 ng/µl) gelinceye kadar gerekli seyreltme ya da deriştirme işlemleri sonrasında ölçümler tekrarlandı.

3.2.2.3. Yeni Nesil Dizileme Tabanlı Panel-Gen Testi

Yeni nesil dizileme tabanlı panel gen çalışması Ion Torrent PGM platformunda yapıldı.

Hedef Genlerin Belirlenmesi

Güncel literatür, OMIM ve HGMD profesyonel veritabanları kullanılarak, CGB kliniği ile ilişkili genlerden non-sendromik CGB ile genotip-fenotip ilişkisi kesin olan *31* gen seçildi (Tablo 3-1).

CGB Panelindeki Genler:***ATF3*** (1q32.3, NM_001674.3); ***AR*** (Xq11.2-q12, NM_000044.3); ***AMHR2*** (12q13, NM_020547.2); ***BNC2*** (9p22.2, NM_017637.5); ***BMP4***(14q22-q23, NM_001202.3); ***CYP11A1*** (15q23-q24, NM_000781.2); ***CBX2*** (17q25.3, NM_005189.2); ***CYB5A*** (18q23, NM_001914.3); ***DMRT1*** (9p24.3, NM_021951.2); ***DHH*** (12q12-q13.1, NM_021044.2); ***DAX1***(Xp21.3-p21.2, NM_000475.4), ***GATA4*** (8p23.1-p22, NM_002052.3); ***HHAT*** (1q32,NM_018194.5); ***HSD17B3*** (9q22, NM_000197.1); ***HOXA4***(7p15-p14, NM_002141.4)*;**HOXB4***(17q21.32, NM_024015); ***HOXB6***(17q21.3, NM_018952.4); ***LHCGR***(2p21, NM_000233.3); ***MAP3K1*** (5q11.2, NM_005921.1);***MAMLD1***(Xq28, NM_005491); ***NR5A1*** (9q33, NM_004959.4); ***POR*** (7q11.2, NM_000941.2); ***RSPO1*** (1p34.3, NM_001038633.3); ***SRD5A2*** (2p23; NM_000348.3); ***STAR***(8p11.2, NM_000349.2); ***SOX9*** (17q24.3-q25.1, NM_000346.3); ***SOX3*** (Xq27.1, NM_005634.2); ***SRY*** (Yp11.3, NM_003140.2); ***WNT4*** (1p36.23-p35.1, NM_030761.4); ***WT1*** (11p13, NM_024426.4); ***ZFPM2*** (8q23, NM_012082.3)

Bu genlerin referans transkriptlerinin kodlayan tüm ekzonik bölgeleri, 10 bazlık intronik (ekzon-intron sınırları) ve varsa mutasyon tanımlanmış diğer kodlamayan ekzonik ve intronik (5'UTR ve 3'UTR, regülatör, derin intronik) bölgeleri hedef olarak belirlendi.

Primer Havuzlarının Oluşturulması

Tüm hedef bölgeler için, Ion Ampliseq sistemi kullanılarak (https://www.ampliseq.com web tabanlı multipleks primer havuzu oluşturma programı; version: 5.6) özgün primer tasarımı yapıldı. Tasarım sonucunda hedef alınan bölgeler 315 amplikona bölünerek (162 ve 153 amplikonluk iki primer havuzu) multipleks PZR tasarımları tamamlandı. Tasarımda 86,94 kb uzunluğunda ortaya çıkan hedef bölgenin toplam 1330 bç'lik parçasına genomik lokalizasyonu ve dizi motifi özelliği gibi nedenlerle çoklu primerlerle yapılan amplifikasyon reaksiyonunun gerekliliği sağlanamadığından uygun tasarım yapılamadı ve bu panel ile hedef bölgelerin % 98,29'i kapsanmış oldu. Her gen için kapsanan bölgelerin yüzde oranları Tablo 3-1'de gösterilmektedir.

Tablo 3-1. Panel-gen testinde yer alan genler, ilişkili olduğu hastalıklar ve kapsam oranları.

GEN	LOKUS	İLİŞKİLİ OLDUĞU HASTALIK (OMIM) / İŞLEVİ	İLİŞKİLİ CGB	KALITIM	KAPSAM (%)
Gonad gelişimi					
CBX2	17q25.33	(O) 46,XY cinsiyet dönüşümü 5, 613080	46,XY KGD	OR	96,59
DHH	12q13.12	(O) 46,XY parsiyel gonadal disgenezi, 607080; 46,XY cinsiyet dönüşümü 7, 233420	46,XY KGD veya PGD	OD/OR	100
DMRT1	9p24.3	cinsiyetin farklılaşmasında erkek cinsiyete	46,XY CGB	OD:*delesyon*	100

		özgü farklılaşma			
GATA4	8p23.1	(O) Konjenital kalp hastalıklarının eşlik ettiği/etmediği gonadal anomaliler	46,XY CGB	OD	71,34
NROB1 (DAX1)	Xp21.2	(O) Adrenal hipoplazi: konjenital, hipogonadotropik hipogonadizmle birlikte, 300200;46,XY seks reversal 2, dozaj bağımlı, 300018	46,XY GD - fonksiyon kazanımı 46,XX KAH	X'e bağlı *duplikasyon* X'e bağlı resesif	100
NR5A1	9q33.3	(O) 46,XY cinsiyet dönüşümü, 612965; Erken over yetmezliği 7 (612964); Adrenokortikal yetmezlik; Spermatogenezde kusur 8, 613957	46,XY CGB	OD/OR	100
MAP3K1	5q11.2	(O) 46,XY cinsiyet dönüşümü 6, 613762	46,XY GD	OD	98,82
RSPO1	1p34.3	(O) Derinin skuamöz hücre karsinomlu palmoplantar hiperkeratozu ve cinsiyet dönüşümü, 610644	46,XX OT CGB	OR	100
SOX3	Xq27.1	(O) Panhipopituitarizm, X'e bağlı, 312000	46,XX T veya OT CGB - *fonksiyon kazanımı*	X'e bağlı;*duplikasyon*	100
SOX9	17q24.3	(O) Otozomal cinsiyet dönüşümü ile kampomelik displazi 114290	46,XY GD 46,XX T CGB - *duplikasyon*	OD OD	100
SRY	Yp11.2	(O) 46,XY cinsiyet dönüşmü 1, 400044; 46,XX cinsiyet dönüşmü 1, 400045	46,XX T CGB - *fonksiyon kazanımı* 46,XY ovaryen CGB	Tranlokasyon OD	100
WNT4	1p36.12	(O) Mülleriyen aplazi ve hiperandrojenizm, 158330	46,XY ovo veya OT CGB / 46,XY KGD - duplikasyon 46,XX T CGB 46,XX MRKH	OD:*duplikasyon* OR OD	94,76
WT1	11p13	(O) Wilms tümörü 1, ürogenital anomalilerle ilişkili, 194070	Frasier sendromu ve Denys-Drash	OD/OR	100
ZFPM2	8q23.1	(O) 46XY cinsiyet dönüşümü 9,616067	46,XY GD	OD	100
BNC2		Over gelişimi ve üremede etkili			100
Gonadal farklılaşma (androjen sentezi ve işlevi)					
AMHR2	12q13.13	(O) Persistan Mülleryan kanal sendromu, tip II ,261550	PMDS	OR	100
AR	Xq12	(O) Androjen duyarsızlığı, 300068 (3); Hipospadias 1, X'e bağlı, 300633	46,XY CGB / Komplet ADS / kısmi ADS , izole hipospadias	X'e bağlı resesif	100
CYB5A	18q22.3	Steroid hormon sentezi düzenleyicisi	46,XY CGB	OR	100

CYP11A1	15q24.1	(O) Adrenal yetmezlik, konjenital, 46,XY cinsiyet dönüşmü, kısmi veya tam, 613743	46,XY seks reversal (kısmi veya tam), adrenal yetmezlik KAH Hipospadias	OR/ OD	100
HSD17B3	9q22.32	(O) Pseudohermafroditizm, jinekomastinin eşlik ettiği, 264300	46,XY CGB	OR	100
LHCGR	2p16.3	(O) Leydig hücre hipoplazisi psödohermafroditizmle birlikte, 238320	46,XY CGB - leydig hücre hipolazisi Erken puberte (erkek)	OR Cinsiyetle sınırlı OD	99,19
POR	7q11.23	(O) Antley-Bixler sendromu, genital anomaliler ve kusurlu steroidogenez, 201750; sitokrom p450 oksidoredüktazın eksikliğinin neden olduğu kusurlu steroidogenez , 613571	Sitokrom p450 oksiredüktaz eksikliği	OR	91,43
SRD5A2	2p23.1	(O) Psödovajinal perineoskrotal hipospadias, 264600	46,XY CGB hipospodias	OR OD	100
STAR	8p11.23	(O) Lipoid adrenal hiperplazi, 201710	46,XY CGB - kolesterol dezmolaz eksikliği (KAH)	OR	100
HHAT	1q32	gonadal farklılaşma 9.GH etkili	46,XY CGB	OR	99,53
İzole hipospadias, kriptorşidizm					
ATF3	1q32.3	Hipospadiasta sorumlu hormon geni	46,XY izole hipospadias	OD	100
MAMLD1	Xq28	(O) Hipospadias 2, X'e bağlı, 300758 (3)	Hipospadias	X'e bağlı	99,37
HOXA4		GWAS çalışmaları ile hipospadiasla ilişkilendirilmiş	Hipospadias	-	50,05
HOXB6		Hipospadiasla ilişkili	Hipospadias	-	100
HOXB4		Hipospadiasla ilişkili	Hipospadias	-	97,16
BMP4		Hipospadias ile ilişkili	Hipospadias	OD	100

KGD: komplet gonadal disgenezi, PYD: parsiyel gonadal disgenezi, KAH: konjenital adrenal hiperplazi, HH: hiipogonadotropik hipogonadizm, OT: ovotestiküler, T: testiküler, PMDS: persisten Mülleryen kanal sendromu

Hedef Bölgelere Ait *Hotspot* Dosyasının Oluşturulması

Analiz aşamasında kullanılmak üzere, her bir hedef bölgedeki bilinen bütün varyasyonlara ait gerekli bilgiler, amplikonların hg38/GRCh38 ile uyumlu genomik yerleşiminin başlangıç ve bitiş koordinatları girilerek ENSEMBL (http://grch38.ensembl.org) veri bankasından indirildi. Her bir varyasyonun yer aldığı

kromozom, başlanğıç ve bitiş koordinatları, ismi, referans ve değişime uğramış allel bilgilerini içeren *excell* dosyası oluşturuldu. Tanımlanmış mutasyonlar. *HGMD Professional 2017.1* sürümünden kontrol edilerek, her bir gen için eksik olan mutasyon bilgileri eklendi. Oluşturulan *excell* dosyası, BED dosya formatına dönüştürülerek, Torrent Server ve Ion Reporter yazılımlarındaki ilgili akış şemasına eklendi.

Hotspot dosyasının hazırlanma nedenleri;

1- Veri analizi aşamasında hotspot dosyasında varolan varyant lokalizasyonlarına öncelikli olarak bakılmasının istenmesi ve varyantların isimlendirilmesinin yapılması

2- *Ion Reporterin* varyant anotasyonu işleminde bir önceki sürüm dbSNP veritabanını kullanmış olması

Kütüphane Hazırlanması

Kütüphane hazırlanması, Ion Ampliseq Library Kit 2.0 (Life Technologies) kullanılarak, firma protokollerine uygun şekilde yapıldı. Kütüphane ürünleri, Ion Xpress Barcode Adapters Kit (Life Technologies) ile barkodlandı. Barkodlanan kütüphane ürünleri Agentcourt AMPure XP reagent ve % 70'lik etanol kullanılarak firma protokollerine uygun olarak saflaştırıldı.

Hedef DNA Bölgelerinin Çoğaltılması

Hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması için iki adet primer havuzu kullanıldı. Her bir örnek için Tablo 3-2'deki gibi iki farklı karışım hazırlandı.

Tablo 3-2. Primer havuzu (2x) için hazırlanan karışım.

Malzeme	Miktar
5X Ion Ampliseq HiFi Mix	4 µl
2X Ion Ampliseq Primer Havuzu	10 µl

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için; hazırlanan iki farklı karışım kullanılarak her bir örnek başına Tablo 3-3'de gösterilen şekilde iki farklı *(pool 1 ve pool 2 olmak üzere)* solüsyon oluşturuldu.

Tablo 3-3. Kütüphane PZR için hazırlanan karışım.

2X Primer Havuzu için Hazırlanan Miks	14 µl
Seyreltilmiş DNA örneği	6 µl
Total hacim	**20 µl**

MicroAmp® adhesive film ile plate kapatıldı, vortekslendi ve kısa süreli santrifüj işlemi ile çöktürüldü. Termal Döngü Cihazı koşulları Tablo 3-4'de gösterildiği termal koşullarda ayarlanarak PZR işlemine geçildi.

Tablo 3-4. Hedef bölge amplifikasyonunda kullanılan termal döngü programı.

Basamak	**Adım**	**Sıcaklık**	**Zaman**
Bekleme	Enzimi aktifleştirmek için	99˚C	2dk
Döngü	Denatürasyon	99˚C	15sn
	Bağlanma ve Uzatma	60˚C	4dk
Bekleme	—	10˚C	Tutma
Döngü sayısı	19 tekrar*(amplikon sayı esas alınarak belirlenir)*		

Primer Dizilerinin Kısmi Olarak Kesilmesi

Önceher bir DNA örneğinin iki farklı primer havuzu ile çoğaltılmış olan PZR ürünleri, her birinden 10'ar µl alınarak,toplam hacim 20 µl olacak şekilde birleştirildi. Birleştirilmiş ürünlere 2 µl FuPa Reagent eklenerek, MicroAmp® adhesive film ile plate kapatıldı, vortekslendi ve ve kısa süreli santrifüj işlemi ile çöktürüldü. Tablo 3-5'te gösterilen programda termal döngü cihazına konuldu.

Tablo 3-5. Primer dizilerinin kesimi için kullanılan termal döngü programı.

Sıcaklık	**Süre**
50 °C	10 dk
55 °C	10 dk
60 °C	20 dk
10 °C	Bekleme (1 saate kadar)

Adaptörlerin Bağlanması ve Barkodlama

Her bir barkod (Ion ExpressTM Barcode), Ion P1 Adapter ve nukleazdan arındırılmış su ile karıştırılarak 1:4 oranında seyreltildi (Tablo 3-6).

Tablo 3-6. Barköd-adaptör karışımı.

İçerik	**Hacim**
Ion P1 Adapter	2 µl
Ion Xpress™ Barcode X[1]	2 µl
Nukleazdan arındırılmış su	4 µl
Toplam hacim	**8 µl**

[1]: Seçilmiş barkod

Primer dizilerinin kısmi kesiminden sonra elde edilen ürüne (22 µl), örnek başına, Tablo 3-7'de gösterilen miktarlarda Switch solüsyonu, barkod adaptör karışımı ve DNA ligaz eklenerek, plate MicroAmp® adhesive film ile kapatıldı, vortekslendi ve damlacıkları toplamak amacıyla kısa süreli santrifüj işlemi ile çöktürüldü. Barkod-adaptörlerin ligasyonu için termal döngü cihazına konuldu.

Tablo 3-7. Barkod-adaptör ligasyon karışımı ve termal döngü programı.

Malzeme	**Hacim**
Switch solusyonu	4 µl
Barkod-Adaptör Karışımı	2 µl
DNA ligaz	2 µl
Toplam Hacim (22 µl ürün ile birlikte)	**30 µl**

Sıcaklık	**Süre**
22 °C	30 dk
72 °C	10 dk
10 °C	Bekleme (1 saate kadar)

Barkod-adaptörlerin ligasyonu sonrasında fazla DNA materyalinin ve enzimlerin uzaklaştırılması amacıyla barkodlanan kütüphane ürünlerinin saflaştırılması aşamasına geçildi.

Barkodlanan Kütüphane Ürünlerinin Saflaştırılması

Bu aşamada Agencourt® AMPure® XP Reagent ve taze hazırlanmış % 70'lik etanol kullanıldı. Her bir örneğe 45 µl (toplam örnek hacminin 1.5 katı) Agencourt® AMPure® XP Reagent eklenerek pipet yardımıyla karıştırıldı ve 5 dk oda sıcaklığına bekletildi. Sonra örnekleri içeren plate manyetik bir rafa (DynaMagTM-96 Side Magnet [Cat.no.12331D]) alındı ve solüsyon berraklaşıncaya kadar (~2 dk) oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası pellete zarar vermeden supernatant uzaklaştırıldı. Ardından her bir örneğe 150 µl taze hazırlanmış % 70'lik etanol eklendi. Plate,manyetik raf üzerinde her iki yana hareket ettirilerek, barkodlanmış amplikonların bağlı olduğu manyetik boncukların etanol ile yıkanması sağlandı ve supernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem ikinci kez tekrarlandıktan sonra alkolün tamamen ortamdan uzaklaştırıldığından emin olmak için 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi veardından kütüphane ürünlerinin normalizasyonu aşamasına geçildi. Çoğaltılmış kütüphaneler Qubit® 2.0 Fluorometer cihazı ile ölçüldü.

Saflaştırılmış Kütüphane Ürünlerinin Normalizasyonu, Ölçümü ve Sulandırma Faktörünü Hesaplama

Platinum® PCR SuperMix High Fidelity kullanılarak kütüphane çoğaltıldı ve saflaştırıldı. Qubit® 2.0 Fluorometer cihazı kullanılarak kütüphane ölçüldü. Ölçümden sonra, taslak reaksiyonu hazırlarken Ion Template kit kullanımı için uygun son konsantrasyonu ~15-22 ng/mL olan sulandırma faktörü belirlendi.

Ion AmpliSeqTM kütüphanesi içeren plate magnetten alındı ve 50 µL Platinum® PCR SuperMix High Fidelity ve 2 µL Library Amplification Primer Mix tüm bead pelletlerine eklendi. MicroAmp® adhesive film ile plate kapatıldı, vortekslendi ve kısa santrifüjle çöktürüldü. Plate 2dk magnet üzerine alındı, sonra pelletten ayrılan ~50 µL süpernatan temiz bir plate'in ayrı ayrı kuyularına aktarıldı. Termal döngü cihazına Tablo 3-8'de gösterilen programa kondu.

Tablo 3-8. Kütüphane amplifikasyonu için termal döngü programı.

Evre	Sıcaklık	Zaman
Tutma	98 °C	2 dk
5 Döngü	98 °C	15 sn
	64 °C	1 dk
Tutma	10 °C	Tutma

Saflaştırma Agencourt® AMPure® XP Reagent ile iki aşamada gerçekleştirildi.

•*I. aşama*, örnek hacim bead oranı 0.5X: Amplikon ve primerler solüsyonda kalırken yüksek moleküler ağırlıktaki DNA bead'lere bağlandı. Süpernatan saklandı.

• *II. aşama*, orijinal örnek hacim bead oranı 1.2X: Amplikonlar beadlere bağlandı ve primerler solüsyonda bırakıldı. Beadler tutularak amplikonlar beadlerden çöktürülerek uzaklaştırıldı

Bu iki aşama aşağıdaki protokole uygun olarak gerçekleştirildi;

İlk Aşama Saflaştırması

25 µL (0.5X örnek hacmi) Agencourt® AMPure® XP Reagent ~50 µL örnek içeren plate kuyularına eklendi. 5 kez dikkatlice pipetle al ver yapılarak DNA ile bead süspansiyonu sağlandı ve MicroAmp® adhesive film ile plate kapatıldı. Karışım oda sıcaklığında 5dk inkübe edildi. Plate en az 5 dk veya solüsyon tamamen berraklaşana kadar magnet üzerine alındı. Süpernatan dikkatli bir şekilde pelletten ayrılarak her bir kuyudan yeni bir plate'in tek bir kuyusuna taşındı. Süpernatan istenen amplikonları içerir.

İkinci Aşama Saflaştırması

İlk aşamada elde edilen süpernatan'a 60 µL (1.2X orijinal örnek hacmi) Agencourt® AMPure® XP Reagent eklendi. 5 kez dikkatlice pipetaj yapılarak DNA ile bead süspansiyonu sağlandı ve MicroAmp® adhesive film ile plate kapatıldı. Karışım oda sıcaklığında 5dk inkübe edildi. Plate en az 3 dk veya solüsyon tamamen berraklaşana kadar magnet üzerine alındı. Süpernatan dikkatli bir şekilde pelletten ayrıldı ve atıldı. Bu aşamada amplikonlar beadlere bağlanırlar ve oluşan pellet saklanır. Yeni olarak hazırlanmış 150 µL %70'lik etanol her bir kuyuya eklendi ve plate beadleri yıkamak için bir kenardan diğer kenara magnet üzerinde hareket ettirildi. Süpernatan dikkatli birşekilde pelletten ayrıldı ve atıldı. Bu işlem iki kez tekrar edildi. Tüm etanol damlalarının kuyulardan ayrılması sağlanmalıdır. Bu sebeple, oda sıcaklığında beadler 5dk magnet üzerinde hava kurutmasına bırakıldı. Aşırı kurutulmamalıdır. Plate magnetten alındı ve 50 µL Low TE pelletteki beadlerin üzerine eklendi. Plate MicroAmp® adhesive film ile kapatıldı, vortekslendi ve damlaları toplamak için kısa çöktürme işlemi uygulandı. Alternatif olarak pipet ayarları 40 µL'ye ayarlanarak plate kapatılmadan önce en az 5 kez pipetaj yapıldı. Bu aşamada ise süpernatan istenen

amplikonları içerir. En az 2dk plate magnet üzerine alındı. Bu aşamadan sonra Qubit® 2.0 fluorometre ile kütüphane ölçüldü ve sulandırma faktörü hesaplandı.

Çoğalmış her kütüphanenin 10 µL'si Qubit® 2.0 Fluorometer (Cat. no. Q32866) ve Qubit® dsDNA HS Assay Kit kullanılarak analiz edilir. Çoğalmış kütüphane genellikle 300–1500 ng/mL konsantrasyondadır. Çoğaltılmış kütüphane konsantrasyonunu belirlemek için:

a) Qubit® dsDNA HS, Qubit® dsDNA HS Buffer kullanılarak 1:200 oranında çalışma sulandırması yapıldı.

b) 10 µL çoğaltılmış Ion AmpliSeqTM kütüphanesi 190 µL boyalı reaktif ile iyice karıştırıldı ve en az 2 dk inkübe edildi.

c) Qubit® 2.0 Fluorometerde konsantrasyon ölçüldü.

d) 20 ile çarpılarak sulandırılmamış kütüphanenin konsantrasyonu hesaplandı.

Bu otomatik olarak Qubit ölçüm cihazında "Calculate Stock Concentration" butonu kullanılarak ve örnek hacmi 10 µL olarak girilerek hesaplanır. Hesaplanmış kütüphane konsantrasyonuna göre ~100 pM olarak ayarlanan sulandırma belirlenir (15 ng/ml için 225bç amplikona kadar, 22 ng/ml 275 bç amplikona kadar). Sulandırılan kütüphane ~100 pM gibi belirlendi ve kütüphaneleri birleştirmeye veya taslak hazırlamaya geçildi.

Taslak (Template) Hazırlanması

Konsantrasyonları eşitlenmiş kütüphanelere emülsiyon bazlı PZR işlemi uygulandı. Her bir amplikona bir bead bağlanması ve yağ küreciği içerisinde bunların klonal olarak milyonlarca kopyasının oluşması sağlandı. Çalışmada aşağıdaki taslak oluşturma protokolü izlenerek emülsüyon PZR ile klonal amplifikasyon ve daha sonra zenginleştirme gerçekleştirildi.

Emülsiyon PZR

Konsantrasyonları eşitlenmiş kütüphaneler aşağıdaki tabloya göre seyreltildi (Tablo 3-9).

Tablo 3-9. Kütüphane seyreltilmesi.

	Ion AmpliSeq™ DNA Kütüphanesi	Ion AmpliSeq™ RNA Kütüphanesi	gDNA Fragment veya Amplikon Kütüphanesi	Ion Total RNA-Seq kütüphanesi
Kütüphane konsantrasyonu	**100 pM**	100 pM	100 pM	100 pM
Kütüphane hacmi	**2 µL**	4 µL	6.5 µL	5 µL
Nükleazdan arındırılmış suyun hacmi	**23 µL**	21 µL	18.5 µL	20 µL
Amplifikasyon solüsyonuna eklenecek total seyreltilmiş kütüphane hacmi	**25 µL**	25 µL	25 µL	25 µL

Bir önceki basamakta hazırlanan stok kütüphane ürününden 2 µl alınarak toplam hacim nükleazdan arındırılmış su ile 25 µl'ye tamamlandı. Böylece kütüphane ürünleri 12 pM'a seyreltildi. Emülsiyon PZR için Tablo 3-10'da gösterildiği gibi amplifikasyon çözeltisi hazırlandı.

Tablo 3-10. emPZR çözeltisi.

Malzeme	**Hacim**
Ion PGM Template Hi-Q™ View Reagent Mix	800 µl
Ion PGM Template Hi-Q™ View Enzyme Mix	50 µl
Nükleazdan arındırılmış su	25 µl
Seyreltilmiş kütüphane	25 µl
Toplam hacim	**900 µl**

Hazırlanan amplifikasyon çözeltisi vorteks ile karıştırıldıktan sonra, üzerine 100 µl Ion PGM Template Hi-Q™ View Ion Sphere Particles eklenerek toplam hacim 1000 µl'ye tamamlandı. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra tüm karışım reaksiyon filtresine (Ion PGM OneTouch Plus Reaction Filter Assembly) yüklendi. Üzerine 2 kez (850+850 µl olmak üzere) reaksiyon yağı ilave edilerek kullanılan kite uygun programda, Ion OneTouch 2 cihazında emülsiyon PZR yapıldı (Şekil 3-1).



1) Ion OneTouch™ Reaksiyon Filtresi
2) amplifikasyon plakasının yerleştirildiği alan
3) Atılacak tüp ve iğnenin konulduğu esnek vana (Pinch valve to hold disposable tubing)
4)Ion OneTouch Recovery Solüsyon Tübü
5) Ion OneTouch Yağ Tübü
6) Atık Kutusu
7) Atık tablası
8) Recovery tüpler için santrifüj
9) Ion OneTouch™ DL Enjektör bölgesi
10) Cihaz Ekranı

Şekil 3-1. *Ion OneTouch 2* cihazında emülsiyon PZR.

Emülsiyon PZR Ürünlerinin Zenginleştirilmesi

Emülsiyon PZR sonrası yaklaşık 10 dk santrifüj yapılarak amplikon yüklü partiküller dibe çöktürüldü. Toplam 100 µl ürün kalacak şekilde her iki tüpteki supernatant kısım atıldı. Üstlerine 500 µl Ion OneTouch Yıkama Solüsyonu eklendi. Yeterli pipetaj yapıldıktan sonra yeni bir eppendorf tüpte her iki tüpte elde edilen ürünler birleştirildi. 2,5 dk santrifüj yapıldıktan sonra renkli olan amplikon yüklü partiküllerin olduğu pellete zarar vermeden tüpte 100 µl kalacak şekilde süpernatant çekilerek atıldı ve zenginleştirme için gerekli çözeltiler hazırlandı.

***Melt-Off* Çözeltisinin Hazırlanması**

Melt-Off çözeltisi için *Tween® Solution* ve1 M NaOH kullanıldı. Final yoğunluklar; % 0.1 Tween® 20 deterjan ve 125 mM NaOH olacak şekilde, 280 µl Tween® Solution ve 40 µl 1 M NaOH kullanılarak 320 µl melt-off çözeltisi hazırlandı.

Streptavidin C1 Boncuklarının Yıkanması

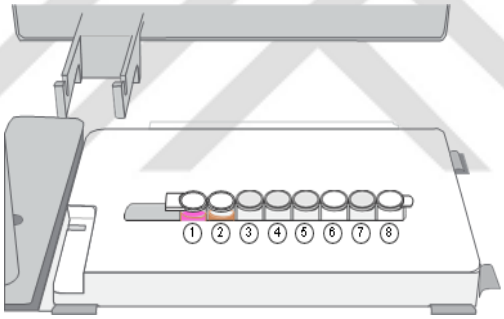
DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads karıştırıldı ve 13 µl alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı. Ependorf, manyetik rafa (*DynaMag™ -2 Magnet*) alındı ve oda sıcaklığında 2 dk bekletilerek boncukların ependorf duvarına yapışması sağlandı. Oluşan supernatant atıldı. 130 µl *MyOne™ Beads Wash Solution* eklenerek ependorf manyetik raftan alındı ve pipet yardımıyla karıştırıldı. Böylece streptavidin C1 boncukları, stok çözeltiden uzaklaştırılmış oldu.

Sekiz Kuyulu Levhanın Doldurulması

Hazırlanan çözeltiler ve emülsiyon PZR ürünü, Tablo 3-11'de gösterilen şekilde 8 kuyulu levhaya yüklendi ve zenginleştirme işlemi için *Ion OneTouch™ ES* cihazına (Şekil 3-2) konuldu. Ek olarak, zenginleştirme sonrası oluşacak ürünün aktarılacağı 0.2 ml ependorf tüpüne 10 µl nötralizasyon çözeltisi konularak cihaza yerleştirildi.

Tablo 3-11. Zenginleştirme aşamasında 8 kuyulu levhanın doldurulması.

Kuyu Numarası	Yüklenen malzeme
Kuyu 1	Emülsiyon PZR ürünü (100 µl)
Kuyu 2	DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads (130 µl)
Kuyu 3	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 4	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 5	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 6	Boş
Kuyu 7	Taze hazırlanmış melt-off çözeltisi (300 µl)
Kuyu 8	Boş



Şekil 3-2. *Ion OneTouch™ ES* cihazında zenginleştirme aşaması.

Zenginleştirme reaksiyonu sonrasında elde ettiğimiz ürün çipe yüklenecek örnek olduğundan hacmi çip kapasitesine göre belirlendi.

Zenginleştirilmiş Ürünlerin Dizilenmesi

Dizileme için Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit kullanıldı. Firma protokollerine uygun olarak; Ion PGM™ dizileme cihazının kanallarının tıkanmasını engellemek amacıyla çalışma başlamadan önce klorid tablet ve 18 MΩ su ile yıkamaları, pH kalibrasyonları[1] yapıldı ve zenginleştirilmiş ürünler çipe (Ion 318™ Chip v2) yüklendi[2]. Tablo 3-12'deki gibi dizileme planı (*hangi kitlerin kullanım bilgiler, örneklere bağlanan barkod bilgileri ve analiz için ek program bilgilerini içerir*) oluşturularak dizileme[3] işlemi başlatıldı.

Tablo 3-12. Dizileme planı.

Ion Reporter	Version: 5.6
Örnek	DNA
Hedef Tekniği	AmpliSeq DNA
Ion reporter iş akışı	DSD_workflow v2
Kütüphane hazırlanmasında kullanılan kit	Ion AmpliSeq 2.0 Library Kit
Kütüphane anahtarı	Ion TCAG (TCAG)
Template Kiti	Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2
Dizileme Kiti	Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit
Akış sayısı	850
Çip Tipi	Ion 318™ Chip v2
3' Adaptör:	Ion P1B (ATCACCGACTGCCCATAGAGAGGCTGAGAC)
Barkod	IonXpress
Boncuk yükleme (%)	10
Anahtar Sinyal (1-100)	30
Kullanılabilir dizi (%)	30
Referans Kütüphane	Hg 38 (*Homo sapiens*)
Hedef Bölgeler	DSD_HYPSPDS_IAD111403_197_Designed
Hotspot Bölgeler	DSD_HOTSPOTS_v2
Eklentiler	coverageAnalysis, FileExporter, RunTransfer, variantCaller (germline_low_stringency)
Proje	DSD_Panel

[1] **Ion PGM cihazının pH'sının otomatik olarak ayarlanması:** Wash 1 solüsyonu olarak 350µl 100 mM NaOH eklenir. Wash 2 solüsyonu olarak 18.2 MΩ ultra saf su içerisine kitten çıkan hazır solüsyon ve 70 µl 100 mM NaOH eklenir. Wash 3 solüsyonu ise 50 ml kitten hazır olarak kullanılır ve cihazın pH'sının kalibrasyonunu sağlar. Wash 2'nin pH'nın 7.49-7.60 civarlarına ulaşması gerekir ve cihaz bunu otomatik olarak ölçer.

[2] **Çipin yüklenmesi ve dizileme:** Ion PGM cihazında okunacak örneğin kapasitesine ve alınmak istenen okuma oranlarına göre seçilebilecek 3 çeşit çip vardır. 314 çip ortalama 80 milyon okuma kapasitesinde, 316 çip ortalama 600 milyon okuma kapasitesinde ve 318 çip 1 milyar 200 milyon okuma kapasitesindedir. Bu oranlar çalışmanın kalitesine ve çipin yüklenmesine göre değişir. Zenginleştirilen ve hedef taslak bağlı ISP içeren örneğe 5 µl Control Ion Sphere Particle eklenir. Control Ion Sphere Particle cihazın doğru okuma yapıp yapmadığını gösteren solüsyondur. Örnek 15.500xg'de 3 dk santrifüj edilir. Geriye 15 µl kalacak şekilde süpernatan dikkatli bir şekilde uzaklaştırılır. Pelletin üzerine 12 µl Sequencing Primer eklenir ve 95C'de 2 dk 37C'de 2 dk inkübe edilir. Bu arada çip yüklemeye hazırlanmak için cihaz üzerinde kontrolden geçirilir. İnkübasyon sonrası örneğe 3 µl Sequencing Polymerase eklenerek oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir. Bu arada kontrolden geçen çipteki fazla sıvı uzaklaştırılır ve okuma alınacak örnek çipe yüklenir. 30'ar sn santrifüj edilerek örneğin çipin her yerine tüm kuyucuklarına yayılması sağlanır. İşlemin en sonunda çipteki sıvı uzaklaştırılır ve çip cihaza yüklenerek dizileme reaksiyonu başlatılır. Çalışmanın gidişatı ve sonucu Ion Torrent Server Browser'dan online olarak takip edilebilir.

[3]Dizileme aşamasında kalıp DNA dizisindeki her bir baz eşleşmesinde şeker-fosfat bağı koparak ortama bir H^+ iyonu salınır. Bu da pH'nın düşerek cihazda okuma sinyali almasını sağlar. Bazlar ortama tek tek salınır ve her eşleşmede bu sinyal değişimi algılanır. Eşleşmeyen baz

olması durumunda hiçbir pH değişimi dolayısıyla sinyal değişimi olmaz. Hazırlanan örnekler bir çipe yüklenir ve cihaz okumaları bu çipteki ürün üzerinden yapar.

Veri Analizi

Dizileme sonrasında Torrent Server yazılımına (Coverage Analysis v5.6.0.1 (1021), Torrent Variant Caller v5.6.0.4 (1022) yama programları ekli) aktarılan verilere ait BAM dosyaları, önce çalışmaların kalite incelemeleri, kapsanmayan ya da yeterli tekrar okuma saptanamamış bölgeler araştırıldı ve analiz için Ion Reporter Uploader programı kullanılarak bulut bazlı Ion Reporter (v.5.6) varyant analizi, annotasyonu ve raporlama programına aktarıldı.

Hedef bölgelere ve hotspot bölgelere ait BED dosyası eklenerek ve gerekli parametreler önerilen aralıklarda tutularak, *Ion Reporter*'da analiz akış şeması oluşturuldu. Her bir hasta, bu akış şeması ile analiz edildi. Her hastada bulunan değişimler, hot spot dosyası lokasyon verilerine dayalı olarak oluşturulan NoRef, NoCall ve dbSNP verisinden alınmış olan minör allel frekansı <0,01 filtrelerine tabi tutularak birkaç aşamada değerlendirildi. Elde edilen varyantlar allel frekansı (MAF) <%1 altında olacak şekilde, 1000 Genom Projesi veri tabanından, UCSC ve RefSeq veritabanlarından ve çalışma grubumuzda gözlenen sık varyantlar grubundan tekrar filtrelendi. Filtrelemelerden sonra amino asit değişikliğine neden olmayan nükleotit değişiklikleri ve ekzon sınırına 10 bç'den uzak olan intronik varyantlar ilk aşamada değerlendirme dışı bırakıldı. Elde edilen tüm homozigot, birleşik heterozigot, heterozigot ve hemizigot varyantlar görüntülendi. Varyant isimlendirmeleri, dbSNP ve HGMD veri tabanlarıyla karşılaştırılarak yapıldı. Varyantlar kodlanan proteine etkisi, türler arasındaki korunmuşluk, ekspresyon paternlerine göre değerlendirildi. Varyantlar, mutasyon çeşitlerine göre öncelikle stop kodon, çerçeve kayması, kırpılma hatası ve missense mutasyonlar olarak sınıflandırılarak önceliklendirildi. Aday genler Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), ClinVar, Genecards ve UCSC Genome portalları kullanılarak incelendi (194-197). Varyantların toplum sıklığı ExAC (*60.706 akrabalık ilişkisi ve çocukluk çağı hastalıkları olmayan, hastalıklara ve topluluklara özgün ekzom verileri*) (198) ve GME Variome (*Orta Doğudan toplanan 2497 bireye ait tüm ekzom dizi verileri*) (199) veritabanlarından kontrol edildi.

Varyantlar, çeşitli tahmin programlarına göre zarar verici lehine olarak değerlendirilenler, sıklıkları, bilinen gelişim yolakları ile olan etkileşimleri, içinde

bulundukları genin ekspresyonu ve fonksiyonu, diğer kohortlardaki varlığı, sıklığı ve son olarak ailede hastalıkla birlikte segrege olma durumları gibi seçim kriterleri uygulanarak yorumlandı. İlk filtrelemede bilinen genler ve gonadal gelişim sürecini etkileyen transkripsiyon faktörleri ile ilişkili olan genlerdeki varyantlar değerlendirmeye alındı ve aile ağacı değerlendirmesine göre kalıtım modeli esas alınarak segregasyonu incelendi. İkinci filtrelemede ise en az iki *in silico* analizde patojenik özellik gösteren, MAF değeri %1'den az olan ve kalıtım modeli ile uyumlu olan tüm diğer genlerdeki değişimler değerlendirildi.

Daha önce tanımlanmamış değişimlerin *in silico* olarak patolojik olup olmadığı çeşitli veritabanları kullanılarak değerlendirildi. Fenotip ve kalıtım modeli ile uyumlu bulunan tanımlanmamış değişimlerin ko-segregasyon çalışmaları yapıldı.

Çalışma sonrasında fenotipik ilişkili hiçbir varyant saptanmayan olguların "noCall" varyantları görsel olarak incelendi, tek yön okuma, düşük tekrarlı okuma ya da yön uyumsuz okuma gibi nedenlerle "noCall" olarak sınıflanan lokasyonlar IGV ile görsel olarak incelendi, okuma olmaması nedeni ile "noCall" olarak sınıflanan lokasyonlar kapsanmayan bölge çalışmaları kapsamında SD ile tarandı.

3.2.2.4. YND ile Saptanan Değişimlerin ve Panel-Gen Testi ile Kapsanmayan veya Düşük Okuma Alınan Bölgelerin Sanger DizilemeÇalışmaları

Çalışmada olgularda saptanan değişimlerin doğrulanması ve aile segregasyon çalışmaları özgün primerler tasarlanarak Sanger dizileme yöntemi ile tarandı (ek-4).

Ayrıca, YND temelli Panel-Gen Testinde kapsanmayan ve düşük okuma alınan bölgeler belirlenerek, veritabanlarında daha önceden tanımlanmış mutasyon içerenler incelendi. YND kapsamında mutasyon saptanmayan tüm olgularda *POR* ekzon 10, 12 ve 16; *MAP3K1* ekzon 1,4 ve 17; XX genotipli olgularda *WNT4* ekzon 1tarandı.

Sanger Dizileme İçin Primerlerin Tasarlanması

Primerlerin tasarlamasında dikkat edilen hususlar; seçilen primerlerin, dbSNP veritabanında daha önceden saptanmış herhangi bir SNP veya tekrarlayan diziiçermemesi, ileri, geri primerlerin bağlanma ısılarının birbirlerine yakın olmasına (en fazla +/- 2-5˚C fark), içerdiği A-T ve C-G nükleotidlerinin oldukca eşit dağılımlı olmasına, boyut olarak 17-24 nükleotid içermesine ve gen bölgesinde beklenen

mutasyonların analiz edilmesine olanak sağlayacak bölgeleri kapsamasına (dizi analizinde ~30-50 bazın iyi okunamayabileceği gözetilerek) özen gösterildi. Özgünlük, UCSC Genome Bioinformatics (http://genome.ucsc.edu/index.html)'den "in silico PZR" interaktif sistemi, NCBI Primer Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) ve Integrated DNA Technologies OligoAnalyzer 3.1 (https://eu.idtdna.com/calc/analyzer) ile test edildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Her bir PZR reaksiyonu için 1X tampon solüsyonu [10X $(NH_4)_2SO_4$] (Thermo Scientific), 25 mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific), % 0-10 DMSO (Biomatik Corporation), 200 µM dNTP (Thermo Scientific), 0,2/0,5 µM ileri ve geri primerler ve 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Thermo Scientific) ve 200 ng gDNA kullanıldı. Karışım, bidistile su (dH_20) ile 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Tüm çalışmalar buz ya da soğuk tüp mahfazası üzerinde gerçekleştirildi. Her PZR çalışmasında amplifiye edilen her bir bölge DNA içermeyen kontrol PZR (negatif kontrol)'ı ile birlikte çalışıldı.

PZR; 95°C de 10 dk denatürasyon, ardından 95°C de 30 sn denatürasyon, primerlerin Tm (Temparature of Melting)'e göre değişen 64°C den 52°C ye kadar ve 30 sn'lik bağlanma ısılarında ve 70°C de 45-90 sn (1 kb / 1 dk) uzama basamaklarından oluşan toplam 40 döngü ve son olarak 70°C de 10 dk'lık uzama ile, PZR yöntemi kullanılarak, termal döngü cihazlarında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrasında PZR örneklerinden 5 µl alınarak, 50 bç'lik merdiven markörü (Sigma) paralelinde 8 µg/ml etidyum bromür içeren %1.2'lik agaroz (Sigma) jelde, 1X TBE tamponunda, 120 V da, 20 dk yürütülerek beklenen bç uzunluğuna göre ayrılması sağlandı. Ultraviyole ışık altında elde edilen bantlar görüntülendi ve kayıt edildi.

PZR Saflaştırılması

PZR ürünlerinin dizi analizi öncesi olan saflaştırması elde bulunan malzemelere göre 2 farklı yöntem ile yapıldı.

Spin Kolon Yöntemi ile Saflaştırma

Saflaştırma, ticari kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche 11732676001). 50 µl PZR ürünü üzerine 250µl Binding

Buffer (bağlanma tamponu) eklendi. Karışım oda ısısında toplama tüpü içerisine alınan filtreli pürifikasyon tüpüne aktarıldı. 13000 rpm'de 60 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken solüsyon atıldı. Pürifikasyon filtresinin üzerine 500 µl (Wash Buffer) yıkama solüsyonu eklendi. 13000 rpm'de 60 saniye santrifüj gerçekleştirildi. Toplama tüpünde biriken solüsyon atıldı. Pürifikasyon filtresinin üzerine 200 µl (Wash Buffer) yıkama solüsyonu eklendi. 13000 rpm'de 60 saniye santrifüj gerçekleştirildi.Toplama tüpü atıldı. Pürifikasyon filtresi steril 1.5 ml'lik ependorf tüpe aktarılarak içerisine 50 µl Elution Buffer (Elüsyon Tamponu) eklendi.13000 rpm'de 60 saniye santrifüj gerçekleştirildi. 1.5 ml'lik ependorf tüpünde biriken üründen 5 µl alınarak 2 µl agaroz yükleme boyası ile karıştırıldı, %1.2'lik agaroz (Sigma) jelde, 1X TBE tamponunda, 120 Voltta, 20 dk yürütülerek kontrol edildi. Ultraviyole ışık altında elde edilen bantlar görüntülenerek kayıt edildi. Ürünler bir sonraki işlem için +4°C'de karanlıkta saklandı.

Enzimatik Yöntem ile Saflaştırma

Saflaştırma işlemi için Exonuclease-I (Lot:00173016-Thermo Scientific) enzimi ve Rapid Alkaline Fosfataz (04898133001-Roche) enzimleri kullanıldı. Termal döngü cihazında PZR protokolü ile 37 °C de 30 dak. , 85°C de 15 dak. ardından 4°C ye getirildi. Saflaştırılan ürünler cihazdan alınarak bir sonraki işlem için +4°C'de karanlıkta saklandı.

DNA Dizi Analizi

PZR yöntemi ile çoğaltılan ve ardından saflaştırılan amplikonların dizi analizi, ABI3500 otomatik sekiz kapilerli elektroforezinde (Applied Biosystem) gerçekleştirildi. Dizi analizi reaksiyonu, saflaştırılan PZR ürünleri ile termal döngü cihazında yapıldı.

Dizi PZR Reaksiyonu

5X tampon solüsyonu olan BigDye buffer (PZR için gerekli kimyasalları içerir), BigDye v3.1 (ddNTP leri ve AmpliTaq DNA polimeraz içermektedir), Primer (PZR da kullanılan primerlerden biri ya da iki çifti ayrı yönlü olarak (*dizi okuma kalitesi için seçilir*) saflaştırılmış PZR ürünü ve dH_2O ilavesiyle final hacmi 10µl olacak şekilde plate (plate - USA Scientific-800-522-8477) üzerinde bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde hazırlandı. Karışım termal döngü cihazına alınarak, protokol toplam 25 döngüde; 96°C de 10 sn ile denatürasyon, 50°C de 5 sn ile bağlanma ve 60°C de 4 dk

ile sonlanma basamakları ile oluşturuldu. 4°C ye gelen cihazdan dizi reaksiyon ürünleri alındı.

Dizi PZR Reaksiyonu Ürünlerinin Saflaştırılması

BigDye dizi reaksiyonu ürünlerinin kullanılmayan primer ve diğer reaktiflerden arındırılması için plate içerisinde ürün başına 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat, 1 µl %2'lik glikojen ve 25 µl %100 soğuk etanol eklendi. Plate aluminyum koruyucu yapışkan bantla (seal) kapatılarak oda ısısında 15 dakika beklendi. 3810 rpm'de 45 dak. santrifüj edildi. Plate üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve plate ters çevrilerek 1100 rpm'de 30 sn.'ye kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 35 µl %70'lik soğuk etanol eklendi. Plate koruyucu yapışkan bant ile kapatıldı ve 3460 rpm'de 15 dak. santrifüj edildi. Plate üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve plate ters çevrilerek 1170 rpm'de 60 sn.'ye kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 10 µl HiDi formamid (Highly Deionized Formamid) eklendi.Örnekler 95 °C de 5 dak.denatüre edildi ve 2 dak. buz üzerinde bekletildi.

Elektroforez Cihazına Yükleme

Plate ABI3500 cihazına yerleştirilip yürütme işlemi seçildi. Cihaz yürütme işleminde kalibrasyonu yapılmış dizileme boya seti olan Dyeset seçildi.

Yürütme voltajı: 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı: 15 kVolts, injeksiyon voltajı:1,6 kVolts, yürütme süresi:2.520 sn, ön yürütme süresi:180 sn, injeksiyon zamanı:8 sn ve veri gecikmesi (data delay): 250 sn. 'ye ayarlanarak ürünler yürütüldü.

Elektroforez Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kapiller Elektroforez sonucunda alınan fasta dosyası ABI Sequencing Analysis v5.4 yazılım ve SeqScape v.3.0 (34) programlarında bilgisayar ortamında analiz edildi. SeqScape v.3.0 programında analiz aşamasına geçmeden önce programa referans dizi yüklendi ve tanıtılan transkriptin ekzon ve intronik bölgeleri program içerisinde gösterildi. Dizileme işleminden sonra fasta formatına alınan olgu dizisi programa yüklendi ve analiz komutu verildi. Bu işlemden sonra, olgu dizisinin hedef gen bölgesi üzerindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu (ileri ya da geri primer veya her ikisi), saflaştırma kalitesi, dizilenen baz sayısı, görüntülenen pik kalitesi, pik yüksekliği ve arka alan kirliliği olup olmadığı kontrol edilerek değerlendirildi. Belirtilen

kontrollerden sonra herhangi birinde farklılık var ise çalışma PZR aşaması veya yeterli örnek mevcutsa, dizi saflaştırma aşamasından itibaren tekrarlandı. SeqScape v.3.0 programında analiz aşamasında, elde edilen olgu dizisi ile referans dizi karşılaştırılarak tanımlanmış değişimler NCBI Entrez SNP, ENSEMBL GeneSNPView ve HGMD gibi veritabanları kullanılarak programda işaretlendi. Elde edilen sonuçlar YND ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

3.2.2.5. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) Analizi

Çalışmamızda MLPA testi, **P334 (***Gonadal Development Disorder* **Lot A3-0615)** ve **P185 (***Intersex* **Lot C2-1015)**kitleri ile uygulandı. MLPA kitlerinin kapsadığı genler ve bölgeler;

P334 Lot A3: ***DMRT1*** ekzon 1-5 (NM_021951.2), ***CYP17A1*** ekzon 1-7 (NM_000102.3), ***SRD5A2*** ekzon 1-5 (NM_000348.3) ve ***HSD17B3*** ekzon 1-3-11 (NM_000197.1);

P185 Lot C2: ***NR0B1*** 5'uç (upstream) bölgesi, ekzon 1-2 (NM_000475.4) ve diğer X kromozomuna özgü problar [***COL4A5*** ekzon 22 (NM_033380.2), ***GJB1*** ekzon 2 (NM_001097642.2), ***PQBP1*** ekzon 3 (NM_005710.2), ***CXorf21*** promotor ve intron 1 bölgesi (NM_025159.2), ***PHEX*** ekzon 14 (NM_000444.4)], ***SRY*** ekzon 1 (NM_003140.1) ve diğer Y kromozomuna özgü problarla [***ZFY*** ekzon 3 (NM_003411.3), ***UTY*** promotor, 5'UTR ve ekzon 15 (NM_182660)], ***WNT4*** ekzon 1-5 (NM_030761.4), ***NR5A1*** ekzon 1-7 (NM_004959.4), ***SOX9*** 5'uç, 5'UTR ve ekzon 1-3 (NM_000346.3)genlerinin ilgili bölgelerinde delesyon/duplikasyon analizi yapıldı.

MLPA Çalışması

Tek bir PZR protokolü ile içerisinde uygun sıcaklıkta bekletme ve ekleme gibi işlemleri ile denatürasyon, hibridizasyon, ligasyon ve amplifikasyon aşamaları DNA Engine (BIORAD)-T100 termal döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Ardından size standart (Lize 500 (GS500-250)) eşliğinde kapiller elektroforez cihazında fragmanlar yürütüldü.

DNA Denatürasyonu ve Prob Karışımı ile Hibridizasyon Aşaması

Denatürasyon öncesinde stok DNA yoğunluğu 25 ng/µl-30 ng/µl olacak şekilde ~25µl miktarda TE tamponu içerisinde çözdürülerek seyreltildi. Prob kitinden SALSA

Prob miks ve SALSA MLPA tamponu çıkarılarak oda ısısında çözülmesi sağlandı. Tampon vorteks ile karıştırıldı ve kısa santrifüjleme ile çöktürüldü. Prob miks pipet yardımıyla iyice karıştırıldı (uzun problar çökebileceğindenbu karışım santrifuj edilmez). DNA çözeltisinden her örnek için 5µl DNA etiketlenmiş 200 µl' lik PZR tüplerine alındı ve termal döngü cihazında 98°C'de 5 dak. denatüre edildi. Her bir örnek için 1,5 µl MLPA tampon ve 1,5 µl prob olmak üzere karışım hazırlandı ve 25°C'de beklemeye alınan tüplere cihaz üzerinde 3 µl olmak üzere dağıtılarak pipetaj yapılarak iyice karışması sağlandı. 95°C de 1 dakika kısa prob denatürasyonundan sonra 37 °C de 16 saat (gece boyu) hibridizasyon işleminin gerçekleşmesi için bekletildi. Hibridizasyon sonrası bekletme yapılmadan ligasyon işlemine geçildi.

Ligasyon Aşaması

Ligasyon aşamasında hazırlık olarak Ligasyon tamponu A ve Ligasyon tamponu B dondurucudan çıkarılarak oda ısısında çözülmesi beklendi. Her bir örnek için 25 µl dH_2O, 3 µl tampon A, 3 µl tampon B ve 1 µl Ligaz 65 enzimi eklenerek karışım hazırlandı. Termal döngü cihazı 54°C'de bekleme basamağına getirilerek sıcaklık 54°C'de iken her bir tüpe hazırlanan 32 µl ligasyon karışımı eklendi ve 54°C'de 15 dakika basamağına geçildi. Elde edilen ligasyon ürünü 4°C 'de saklandı.

PZR Aşaması

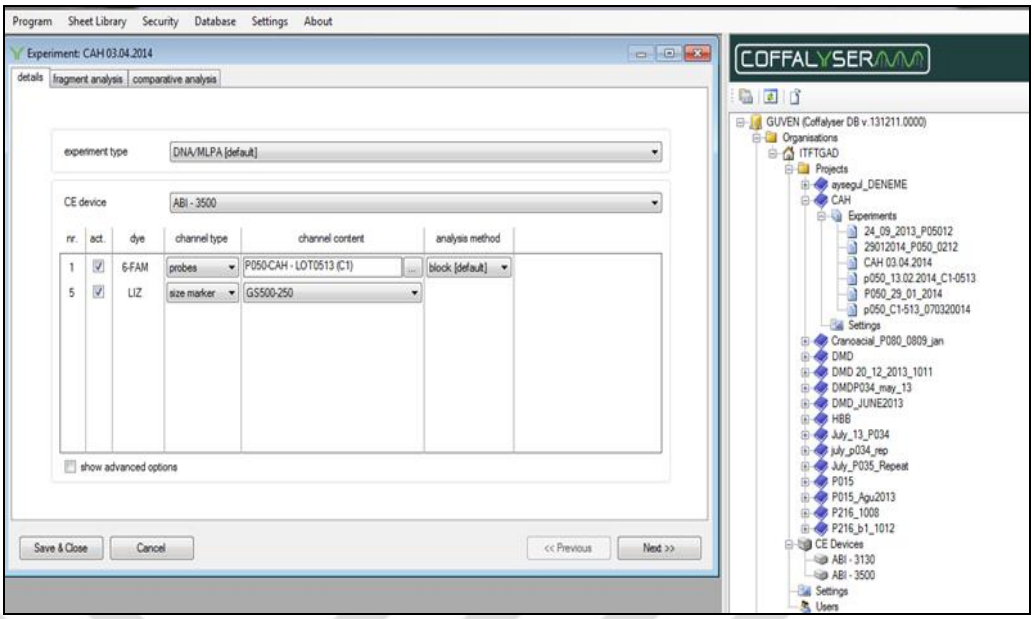
Ön hazırlık olarak dondurucuda bekleyen SALSA PZR tamponu, SALSA PZR primeri (FAM boyalı) çıkarılarak çözülmesi beklendi. Karışım için örnek başına ayrı bir tüpe 7,5 µl dH_2O, 2 µl SALSA PZR primeri ve 0,5 µl SALSA polimeraz enzimi eklendi ve iyice pipetle karıştırılarak homojen şekilde olması sağlandı. Ligasyon ürünlerinin üzerine 10'ar µl eklendi.PZR karışımı hazırlanırken, primerler floresan işaretli olduğundan ışıktan korunmasına dikkat edildi. Her bir örnek için eklenen karışımın pipetaj ile karışması sağlandı. 20°C'de bekleme aşamasındaki termal döngü cihazında sonraki basamağa geçiş yapıldı; 35 döngüde; 95°C de 30 saniye, 60°C de 30 saniye,72°C de 60 saniye, 72°C de 20 dakika ve 4°C de bekleme aşamaları. 4°C'ye gelenörnekler için kapiller elektroforezine yükleme ve fragmanların yürütülmesi aşamasına geçildi. PZR ürünleri saklanacaksa ürünlerin ya ışık almayan kutuda saklanmasına ya da alüminyum folyo ile sarılmasına dikkat edildi.

Kapiler Elektroforez Cihazı İle Fragmanların Yürütülmesi Aşaması

Boş bir miks tüpüne yürütülecek örnek başına 0.2 µl LIZ size standard (Liz-500, Lot:0904226, Applied Biosystems) ve 9.5 µl formamid (Highly Deionized - HiDi) konularak karıştırıldı ve kapiller elektroforezine yüklenmek için oluşturulan numaralandırılmış ABI3500 cihazı için uygun olan plate (USA Scientific-800-522-8477) herbir kuyuya bir örnek basına 9,7 µl dağıtıldı. Üzerine 0,3 µl PZR reaksiyon ürünü plate kuyularına olgu numaralarına göre dağıtıldı. Plate kuyucuklarının üzeri uygun septayla (AB Applied Biosystems-182901S9R) kapatılarak, plate santrifüjünde (BIOSAN LMC300) 4000 rpm de 2 dakika çevrilerek dibe çökmesi sağlandı. Santrifüj bitince, plate ABI3500 cihazına yerleştirildi ve kapiller elektroforez cihazında yürütme ayarları düzenlenerek fragman platformunda yürütme işlemine geçildi. Yürütme voltajı; 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı; 15 kVolts, injeksiyon voltajı: 1,6 kVolts, yürütme süresi: 2.520 sn, ön yürütme süresi: 180 sn, injeksiyon zamanı: 8 sn ve veri gecikmesi süresi (data delay): 250 sn. Kapiller sıcaklığı 60 °C, fsa formatındaki ham veri Coffalyser.net (v.1400701.0000) programı kullanılarak değerlendirildi.

Veri Analizi

Kapiller elektroforez cihazından fsa formatında elde edilen fragmanlar Coffalyser.Net (MRC-Holland) programına tanıtılarak aktarıldı. Coffalyser.net programının gerekli analiz ayarları (prob türü, örnek türü, kitin lot numarası ve analiz türü, Şekil 3-3) yapılarak örnekler yüklendi. Referans örnekler seçilerek, önce fragman analizi ardından karşılaştırmalı istatistiksel analiz yapıldı. Analiz işleminden sonra pik değerleri ve bar grafikleri değerlendirilerek var olan kopya sayısı değişiklikleri tanımlandı. Şüpheli sonuç gösteren olgular tekrar MLPA işlemine alındı ve süreç tekrarlandı. Tek ekzonla sınırlı delesyon ve duplikasyonlarda prob ligasyon bölgesindeki varyasyonların dışlanması amacıyla Sanger yöntemiyle dizileme yapıldı.



Şekil 3-3. MLPA analizinin Coffalyser programındaki görüntüsü.

3.2.3. *Ion Torrent* Platformunda CNV Analizi

Ion Torrent PGM'de, Cinsiyet Gelişim Bozukluğu ile ilişkili 31 genin kodlayan ekzon bölgeleri ile ekzonların 10 bç intron sınır bölgelerini içeren 86,94 kb'lik alanda toplam 315 amplikon ile % 98,29 kapsam (coverage)'da yapılan dizileme sonucunda elde edilen veri kullanılarak CNV analizine özgün iş akışı oluşturuldu. Panel-gen testinde nokta mutasyonu saptanan 15 olgunun verileri kullanılarak *Ion Reporter* programında CNV analizi için referans olarak kullanılmak üzere *baseline* oluşturuldu. Ion reporter v5.2 programında yapılan CNV analizinde güvenlik (confidence) skorları (10) ve MAPD değeri (0.3) temel alınarak uygulanan filtreleme işleminden sonra fenotiple ilişkili olan varyantlar önceliklendirdi. Bir olguda veritabanları ve güncel literatür temel alınarak patojenik olduğu öngörülen *SOX3* tüm gen heterozigot delesyonunu doğrulama çalışması için gerçek zamanlı PZR çalışması yapıldı. Doğrulama çalışması kapsamında *SOX3* geni ekzon 1'i hedef alan, çalışmaya uygun boyutta fragman primerleri tasarlandı. Kontrol geni olarak laboratuvarda önceden kopya sayısı çalışmalarında kullanılmış olan *CENPJ* 12. ekzon hedefli primerler kullanıldı (ek-4). Gerçek zamanlı PZR çalışmasında çift iplik DNA-bağlayıcı (*hibridizasyon temeline dayanan*) floresan boya olarak SsoFast EvaGreen (Bıo-RAD) tercih edildi.

3.2.4. Proteinin Üç Boyutlu Yapısının Modellenmesi

Proteinin normal ve mutant formlarının üç boyutlu yapıları I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER) *in silico* tahmin programında Local Meta-Threading-Server arayüzü kullanılarak *multiple-threading alignment (*çoklu hizalama) temeline dayanarak oluşturuldu. Veritabanlarındaki protein modellerine homoloji gösteren ve çoklu hizalama temeline dayanarak program tarafından 5 adet farklı modeller oluşturuldu. Genellikle, tahmin programında proteinlerin üç boyutlu yapıları -5 ve +2 arasında farklı güvenirlik skorlarına göre değerlendirilmekte ve en yüksek puan daha güvenilir modele işaret etmektedir. Proteinin ikincil yapı tahminleri de 0 ile 9 arasında skorlanmaktadır ve yüksek skor daha güvenilir yapıyı öngörmektedir. Protein çözünürlük tahminleri 0'dan 9'a kadar; "0" membrana gömülü (hidrofobik) aminoasitleri, "9" ise serbest (hidrofilik) olanları göstermek üzere değerlendirilmektedir. Modelin B-faktör değeri ise proteindeki aminoasit/atomların tahmini termal devinim *(mobility)* değerini göstermekte olup, negatif değerlere gidildikçe yapıdaki kararlılık artışını göstermektedir (200).

Proteinin üç boyutlu yapı modeli *in silico* olarak *POR* geni normal ve mutant (p.Pro399_Gln401dup) formları için tasarlandı ve PyMOL programında görüntülendi. İkincil yapı, çözünürlük, termal devirgenlik analizleri yabanıl ve mutant tipler için yapıldı ve her iki form için FAD domeindeki alfa heliks oluşumundaki *p*P399 ve *p*M408 aminoasitleri ile domeinin stabilizasyonu ve katlanmasında önemli rolü olan *p*C437, *p*P438 ve *p*S439 aminoasitlerinin Cα atomları arasında mesafe ölçülerek mutasyonun ligand-domeine etkisi öngörüldü.

4. BULGULAR

4.1. YND Teknik Sonuçlarına Genel Bakış

Ion Torrent platformunda yürütülen YND çalışması sonucunda elde edilen metrik sonuçlar, kapsam, derinlik ve varyant saptama bilgileri Tablo 4.1'de sunulmaktadır.

Tablo 4-1. YND çalışmalarının *Torrent Server* ve *Ion Reporter* arayüzlerinden elde edilen metrik sonuçları.

Değerlendirme parametreleri	**YND çalışmaları**	
	1.	2.
Referans genoma haritalamadan önceki metrik değerler		
Toplam baz sayısı	1,5 G	1,52 G
Toplam okuma sayısı (bç)	6,408,899	7,193,235
Kullanılabilir okuma (%)	72	77
Çipin dolma yüzdesi	80	84
Zenginleştirme yüzdesi	100	100
Klonalite (%)	79	85
Son kütüphane ürünleri (%)	90	89
Kontrol fragmanlar (%)	2	2
Adaptör dimerleri (%)	0	2
Düşük kalite (%)	8	7
Okumaların aritmetik ortalaması (bç)	234	211
Okumaların ortancası (bç)	256	221
Okumaların taban değeri (bç)	321	321
Referans genoma haritalama metrik değerleri		
Haritalanan toplam baz	1,44 G	1,46 G
Haritalanan baz (%)	99	99
Haritalanamayan baz (%)	1	1
Okumaların ortalama doğruluğu (1x)	99,3	99,3
AQ17 kalite skorunda olan baz sayısı	1,37 G	1,38 G
Varyant analizi metrik değerleri		
Ortalama derinlik [1]	632,7	583,3
Gözlenen ortalama varyant	146	145
Düşük okuma alınan amplikon sayısı	5	9
Ortalama *No Call* varyant sayısı[2]	946	945

[1]hedef genomik bölge ile eşleşen bölgelerin kaç tekrarla okunması
[2]baz olarak isimlendirilemeyen ve/veya varyant çağırma parametrelerini geçemeyen bazlar

4.2. Olgu Sonuçları

Klinik muayene ve hormonal bulguları ile ayırıcı tanıda non-sendromik CGB düşünülen ve çalışmaya alınan farklı ailelerden 44 indeks olgunun ikisi 46,XX, kırk biri 46,XY, bir olgu ise 47,XXY kromozom kuruluşuna sahipti. Çalışma grubumuzda akraba evliliği oranı ortalama % 52.3 idi, bunlardan%47.8'i birinci derece kuzen evliliği, diğerleri ise daha uzak akrabalıklardı.

YND çalışması kapsamında 44 ailenin indeks olgularında, CGB ilişkili 31 genin bütün ekzonlarını ve ekzon/intron sınırlarına tasarlanan hedefe yönelik YND paneli ile çalışıldıktan sonra yapılan biyoinformatik analizlerde, 17 olguda 8 farklı gende (*HSD17B3, DHH, NR5A1, LHCGR, WT1, POR, ZFPM2* ve *HOXA4*) farklı mutasyon saptandı.

Olgular CGB'lerin Chicago sınıflaması temel alınarak 46,XY CGB ve 46,XX CGB olmak üzere iki temel grupta değerlendirildi. 46,XY CGB olguları; i) *gonadal gelişim kusurları*, ii) *androjen sentez bozuklukları*, iii) *androjen işlev kusurları* ve iv) *izole (hipospadias, kriptorşidizm vb)*olmak üzere gruplandırıldı.

4.2.1. 46,XY CGB'li Olguların Fizik Muayene, Hormonal Bulguları ve Genetik Analiz Sonuçları

4.2.1.1. Gonadal Gelişim Kusurları

Bu grupta yer alan toplam 6 olgunun demografik, klinik, hormonal, görüntüleme bulguları Tablo 4.2'de ve saptanan genetik varyantlar ve değerlendirilmeleri Tablo 4.3' de topluca gösterildi. Olguların birinde (Olgu 4) daha önce tanımlanmış bir mutasyon, 5'inde ise (Olgu 1-3, 5 ve 6) ilk defa bu çalışmada saptanan (*novel*) ve *in silico* analiz programlarında hastalık ilişkili olarak öngörülen varyant saptandı. Olgu ve ailelerine ait aile ağacı, YND temelli panel gen testi ile saptanan değişimlerin IGV görüntüleri ile Sanger doğrulama çalışmalarının elektroferogram görüntüleri ve MLPA analiz görüntüleri olgu bazında gösterildi.

Tablo 4-2. 46,XY Gonadal gelişim bozukluğu olan olguların başvuru yaşındaki fizik muayene, hormonal ve görüntüleme bulguları

	Olgu 1. (DSD#1)	Olgu 2. (DSD#2)	Olgu 3. (DSD#3)	Olgu 4. (DSD#4)	Olgu 5. (DSD#5)	Olgu 6. (DSD#6)
Başvurudaki yaşı	1	13	YD	$2^{6/12}$	$1^{2/12}$	$4^{8/12}$
Başvuru nedeni	Kuşkulu genitalya	Hipospadias	Kuşkulu genitalya	Kuşkulu genitalya	Hipospadias	Kuşkulu genitalya
Yetiştirilen cinsiyet	erkek	erkek	erkek	erkek	erkek	kız
Akraba evliliği	1ºkuzen	1ºkuzen	1,5ºkuzen	2ºkuzen	yok	yok
Ailede etkilenmiş olgu	+	-	+	-	+	-
Ağırlık /SDS	8,75 / -1,2	39,9 / -1,1	2,7 / -1,4	6,2/ 0,2	11,2 / 0,4	16,1 / -1,0
Boy / SDS	74 / -0,9	167 / -1,2	47,5 / -1,1	59,3 / -0,2	81 / 0,5	104,5 / -1,0
Dismorfik /eşlik eden diğer sistem bulguları	Yüksek damak, üst dudak cupit's bow şeklinde, bil. hokey çizgisi	yok	yok	Hipertelorizm,basık burun kökü	yok	2. -3. ayak parmakları arasında parsiyel sindaktili
Dış Genital	kuşkulu	erkek	kuşkulu	kuşkulu	erkek	dişi
Fallus boyu	1,2	6	1,5	dorsal 3 / ventral 1	2,5	1,5
Hipospadias	-	glanduler	penoskrotal	penoskrotal	glanduler	-
Testisler (sağ/sol)	Bil. inguinalde T 1/1ml	Bil. skrotumda T 3/3 ml	Bil. inguinalde T 0,5/0,5 ml	Palpe edilemedi	Bil. skrotumda T 2/2 ml	-
EMS skoru	3	4	5	6	8	3
Gonadektomi	-	-	-	- *	-	+
Histopatoloji	-	-	-	-	-	Bil. immatür testis dokusu, tuba +epididim
Ayırıcı tanı	LH Duyarsızlığı	46,XY CGB	PARK	46,XY TGD	PARK	46,XY TGD

(*devamı*)

LH (mIU/ml)	1,33	0,5	29,4	6,1	0,5	1,6
FSH (mIU/ml)	1,97	1,7	14,4	5,6	3,8	21,3
Testosteron (ng/ml)	0,34	0,26	1,24 *Mini-puberte*	1,44 *Mini-puberte*	0,03	0,03
17-OH PG (ng/ml)	0,2	-	2,3	N	N	0,57
Kortizol (µg/dl)	11	21,3	14,7	N	N	N
İnhibin-B (pg/dl)	N	-	-	N	-	↓
AMH (ng/ml)	-	↓	↑	N	N	↓
Androstenedion (ng/ml)	<0,3	-	N	0,69	-	↓
Uyarılmış T (ng/ml)	0,3	-	1,48	1,35	-	0,22
T/DHT	0,17	3,08	21,3	5,5	14,9	-
T/AS	N	-	-	-	N	-
Pelvik USG	Wolf yapıları (+) Testis (+/+)	Wolf yapıları (+) Testis (+/+)	Testis (+/+)	Uterus (+) Sağ testis (+)	Testis (+/+)	Testis (+/+)

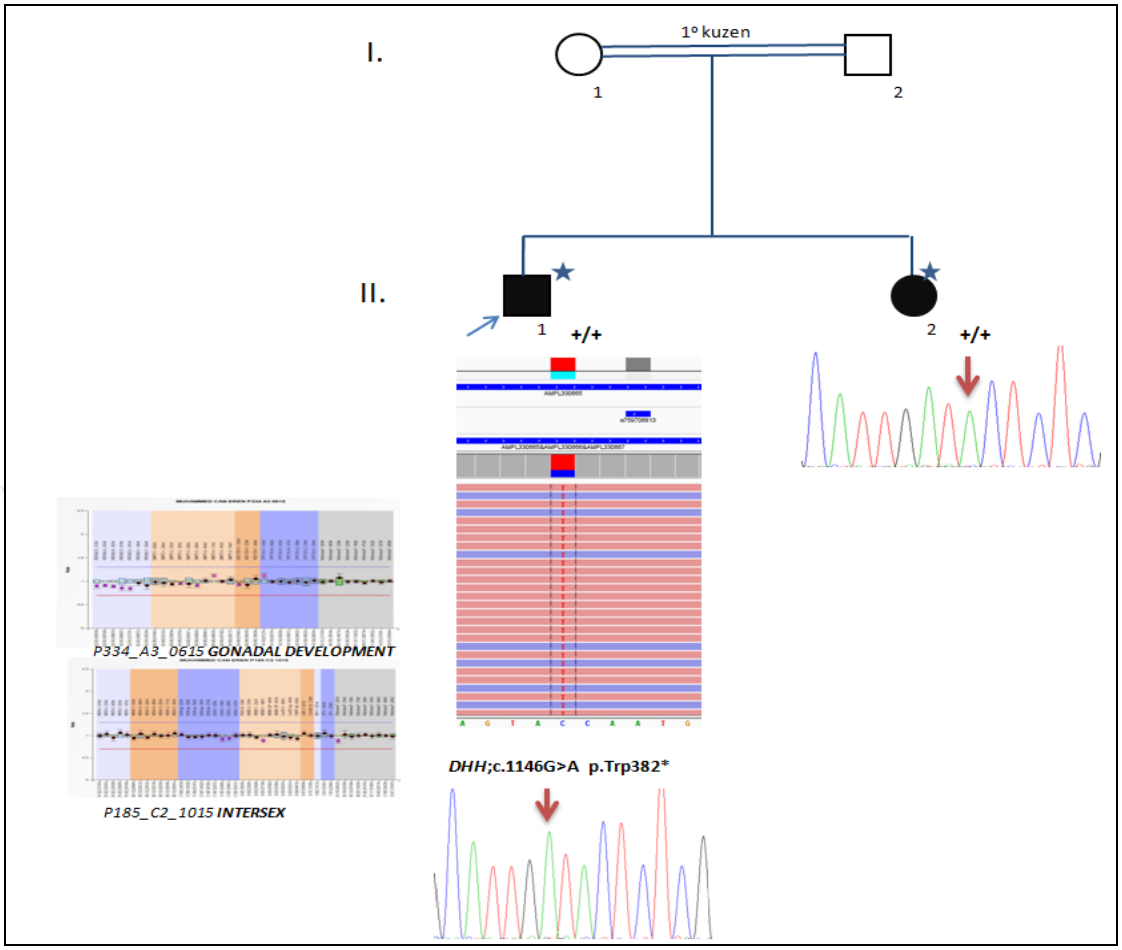
tam gonadal disgenezi (TGD), parsiyel androjen resptör kusuru (PARK), normal değer aralığında (N)

* Laparoskopik eksplorasyon yapılmış, sağ ve sol testis renal lojda bulunarak skrotuma fikse edilmiştir.

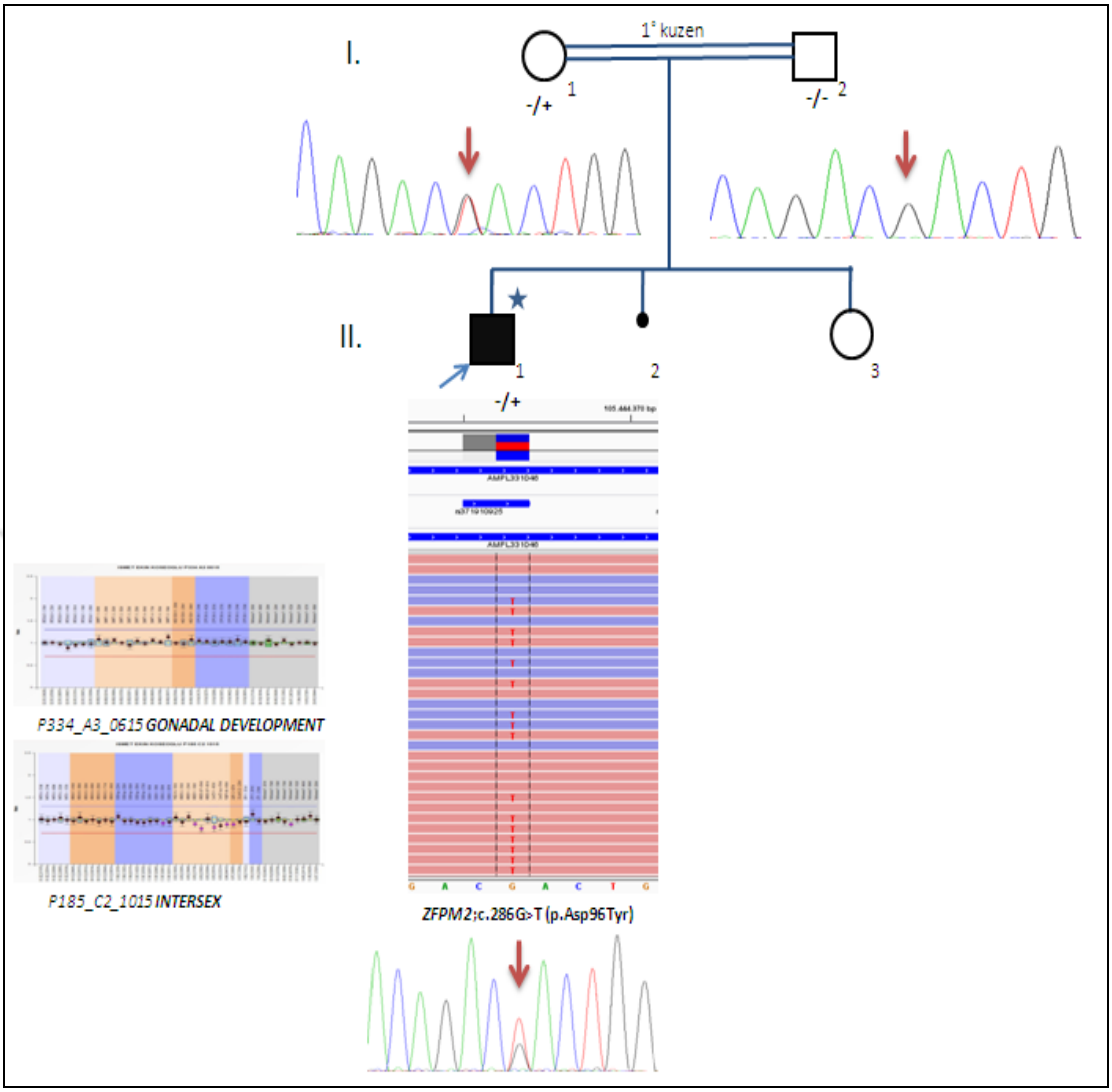
Tablo 4-3. 46,XY Gonadal gelişim bozukluğu olan olguların genetik analiz sonuçları.

		Olgu 1. (DSD#1)	Olgu 2. (DSD#2)	Olgu 3. (DSD#3)	Olgu 4. (DSD#4)	Olgu 5. (DSD#5)	Olgu 6. (DSD#6)
Karyotip		46,XY	46,XY	46,XY	46,XY	46,XY	46,XY
Gen		*DHH*	*ZFPM2*	*DHH*	*WT1*	*NR5A1*	*NR5A1*
Referans transkipt		NM_021044.2	NM_012082.3	NM_021044.2	NM_024426.4	NM_004959.4	NM_004959.4
Ekzon		3	3	1 ve 3	9	4	3
Zigozite		Hom.	Het.	Hom. ; Hom.	Het.	Het.	Het.
Nükleotid		c.1146G>A	c.286G>T	Ekz.1'de c.71G>C; Ekz.3'dec.1063C>T	c.1385G>T	c.247G>T	c.151G>T
Protein		p.Trp382*	p.Asp96Tyr	p.Gly24Ala; p.Arg355Cys	p.Arg462Leu	p.Val83Leu	p.Glu51*
id dbSNP / HGMD		-	-	-;-	CM041493	-	rs775441984
Varyant sıklığı		-	ExAC 0.000003/1 GME Variome 0.0035	ExAC 0.00002/1; -	-	-	ExAC 0.00002/1
Referans		Bu çalışma	Bu çalışma	Bu çalışma	Tanımlı (1, 2)	Bu çalışma	Bu çalışma
***In silico* analizler**	**Mutation Taster**	disease causing (0.99)	disease causing (0.99)	disease causing (0.99); disease causing (0.99)	-	disease causing (0.99)	disease causing (1.0)
	PolyPhen-2 (Hum Var)	-	Benign (0.37)	Probably damaging (0.99); Probably damaging (0.73)	-	Possibly damaging (0.84)	-
	Provean	-	Neutral	Deleterious; Neutral	-	Deleterious	-
	SIFT	-	Damaging	Damaging; Tolerated	-	Damaging	-
MLPA	**P334 A3(Gon.Dev)**	N	N	N	N	N	N
	P185 C2 (Intersex)	N	N	N	N	N	N

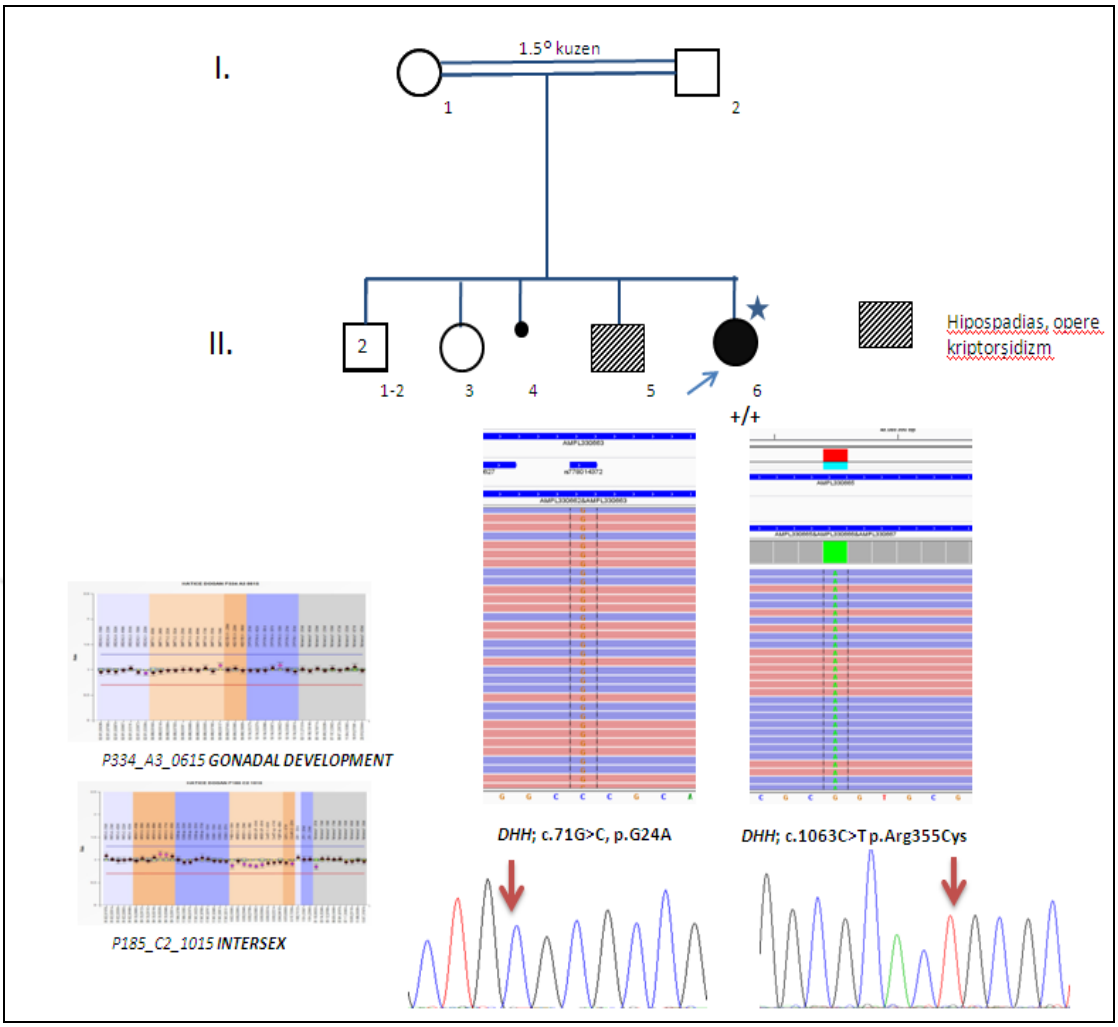
1. Royer-Pokora (2004) *Am J Med Genet* 127A: 249 PubMed: 15150775; **2.** Barrera (2016) *Science* 351: 1450 PubMed: 27013732



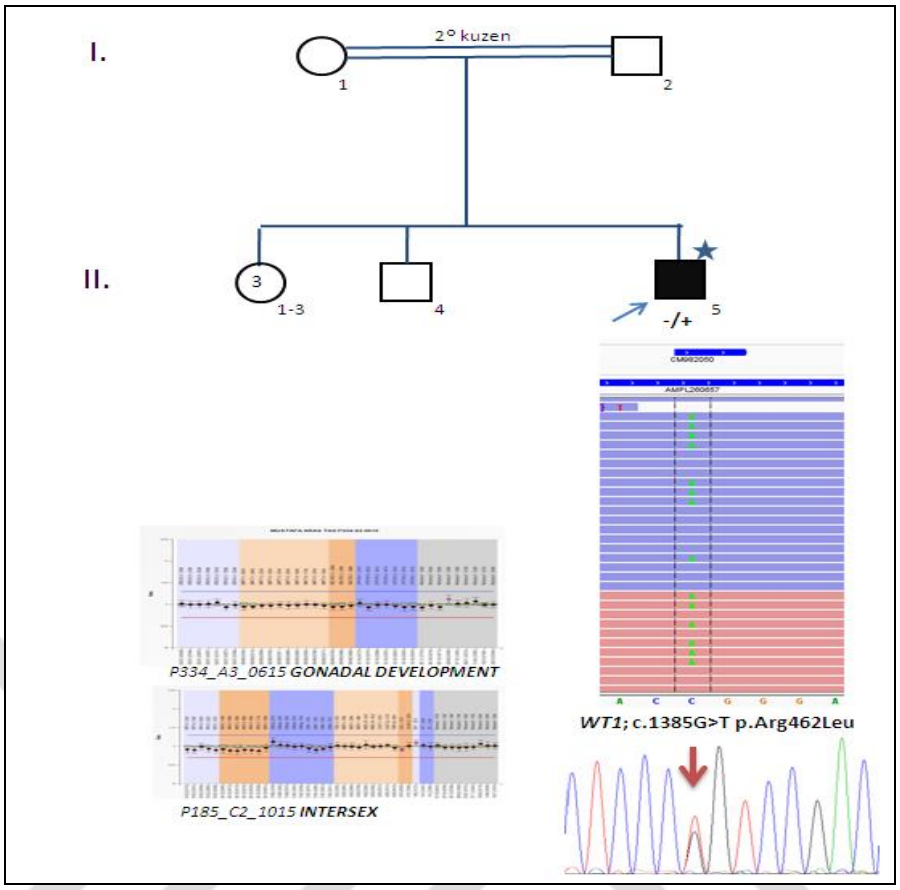
Aile(DSD#1): Aile ağacı, indeks (II-1)'e ait panel-gen testinde saptanan *DHH* c.1146G>A (p.Trp382*) homozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; etkilenmiş kardeşinde (II-2) aynı mutasyonun homozigot formda elektroferogram görüntüsü, indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri



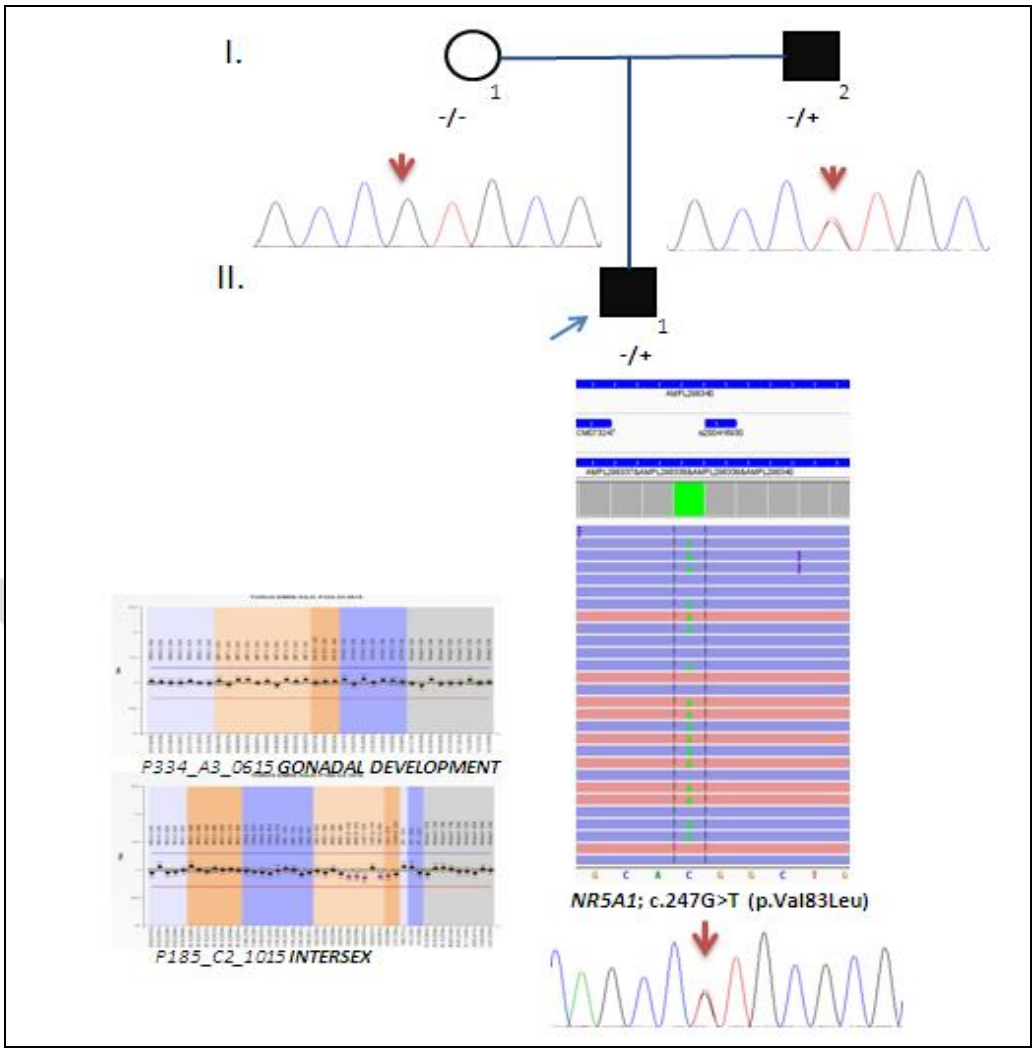
Aile(DSD#2): Aile ağacı, indeks (II-1)'e ait panel-gen testinde saptanan *ZFPM2* c.286G>T (p.Asp96Tyr) heterozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; olgunun anne (I-1) ve babasında (I-2) segregasyon analizi, indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri



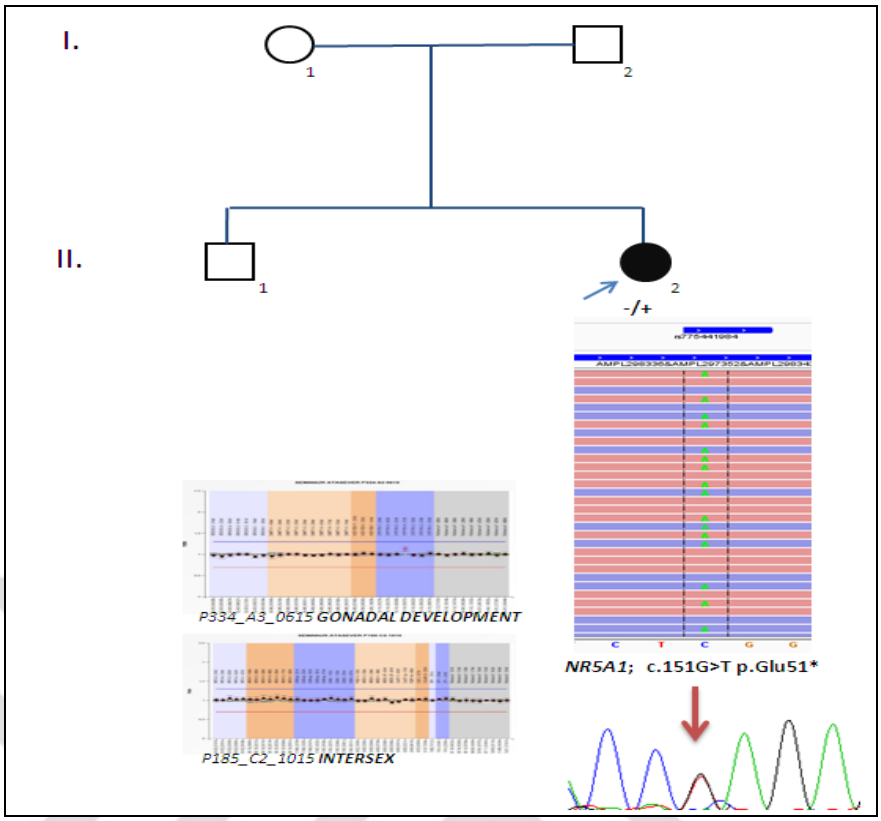
Aile(DSD#3): Aile ağacı, indeks (II-6)'e ait panel-gen testinde saptanan *DHH* c.71G>C(p.Gly24Ala) ve c.1063C>T (p.Arg355Cys) homozigot mutasyonlarının IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri



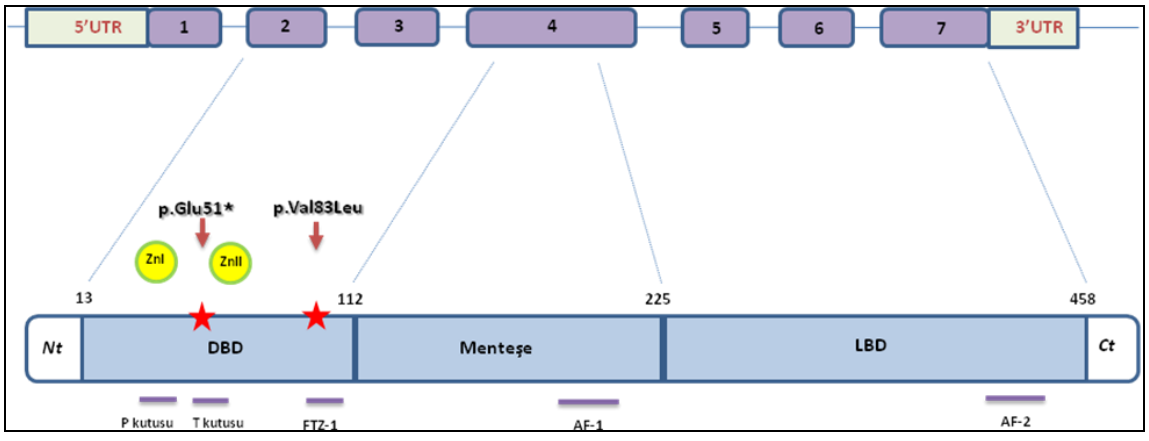
Aile(DSD#4): Aile ağacı, indeks (II-5)'e ait panel-gen testinde saptanan *WT1* c.1385G>T (p.Arg462Leu) heterozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri



Aile(DSD#5): Aile ağacı, indeks (II-1)'e ait panel-gen testinde saptanan *NR5A1* c.247G>T (p.Val83Leu) heterozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; olgunun etkilenmiş babasında aynı değişimin elektroferogram görüntüsü, indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri



Aile(DSD#6): Aile ağacı, indeks (II-2)'e ait panel-gen testinde saptanan *NR5A1* c.151G>T (p.Glu51*) heterozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri



Şekil 4-1. *NR5A1* geninde saptanan mutasyonların protein üzerindeki (Q13285, NP_004950) yeri.

4.2.1.2. Androjen Sentez Bozuklukları

Bu grupta yer alan toplam 10 olgunun demografik, klinik, hormonal, görüntüleme bulguları Tablo 4.4'de ve saptanan genetik varyantlar ve değerlendirilmeleri Tablo 4.5' de topluca gösterildi. Olguların dördünde (Olgu 7,8,11 ve 15) daha önce tanımlanmış, bir olguda (Olgu 14) biri tanımlı ve biri daha önce tanımlanmamış birleşik heterozigot, 5'inde ise (Olgu 9,10,12,13 ve 16) ilk defa bu çalışmada saptanan ve *in silico* analiz programlarında hastalık ilişkili olarak öngörülen varyant saptandı. Olgu ve ailelerine ait aile ağacı, YND temelli panel gen testi ile saptanan değişimlerin IGV görüntüleri ile Sanger doğrulama çalışmalarının elektroferogram görüntüleri ve MLPA analiz görüntüleri olgu bazında gösterildi.

Tablo 4-4. 46,XY Androjen sentez bozukluğu olan olguların başvuru yaşındaki fizik muayene, hormonal ve görüntüleme bulguları.

	Olgu 7. (DSD#7)	Olgu 8. (DSD#8	Olgu 9. (DSD#9)	Olgu 10. (DSD#10)	Olgu 11. (DSD#11)	Olgu 12. (DSD#12)	Olgu 13. (DSD#13)	Olgu 14. (DSD#14)	Olgu 15. (DSD#15)	Olgu 16. (DSD#16)
Başvurudaki yaşı	3	3	17	YD	15	6	8	7	0,5	8
Başvuru nedeni	Kuşkulu genitalya	Kuşkulu genitalya	Primer amenore	Hipospadias	Primer amenore	Kuşkulu genitalya	Kuşkulu genitalya	Hipospadias	Kuşkulu genitalya	Kuşkulu genitalya
Yetiştirilen cinsiyet	kız	kız	kız	erkek	kız	kız	kız	erkek	kız	kız
Akraba evliliği	1ºkuzen	1ºkuzen	1ºkuzen	1ºkuzen	1ºkuzen	1ºkuzen	2ºkuzen	1,5ºkuzen	1ºkuzen	1.5ºkuzen
Ailede etkilenmiş olgu	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
Ağırlık /SDS	12 /-1,0	13,5 / -0,7	54,8 / -0,1	4,2 / 0,2	61,6 / -0,1	26,9/ 1,4	31 / 1,5	21,5 / -0,7	7,0 / -1,0	22,1 /-0,5
Boy / SDS	98,3 / 0,4	98,5 / 0,4	162,7 / -0,1	54,2 / 0,6	161,3 / -1,3	118,4 / 0,0	137 / 1,9	126,5 / 0,8	65,6 / -0,7	125,3 / -0,3
Dismorfik /eşlik eden diğer sistem bulguları	yok	yok	yok / astım	yok	Hipotelorizm, bil. klinodaktili / astım	yok / astım	aşağı çekik palpebral fissurlar, bil. hallux valgus	yok	yok	Molar hipoplazi
Dış Genital	dişi	dişi	dişi	erkek	dişi	dişi	dişi	erkek	dişi	dişi
Fallus boyu	-	1,3	dorsal 2,5 / ventral 2	1,5	-	-	1,5	4	-	-
Hipospadias	-	-	-	penoskrotal	-	-	-	penoskrotal	-	-
Testisler (sağ/sol)	Sol: inguinalde, 2 ml / Sağ: nonpalpabl	Bil.inguinalde	Bil.skrotumda T 1/1 ml	Bil.skrotumda T 1/1 ml	Palpe edilemedi	Bil.inguinalde T 1/1 ml	Bil.inguinalde T 1/1 ml	Sol: inguinalde, 2 ml / Sağ: nonpalpabl	Bil.ınguinalde	Bil.inguinalde T 0,5/0,5 ml
EMS skoru	2	3	3	6	0	2	2	1	4	2
Gonadektomi	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Histopatoloji	İmmatür testis dokusu	diffüz Leydig hücre hiperplazisi	-	-	İmmatür testis dokusu	İmmatür testis dokusu	-	-	İmmatür testis dokusu	İmmatür testis dokusu
Ayırıcı tanı	LH duyarsızlığı	17β-OH steroid red. eksikliği	17β-OH steroid red. eksikliği	LH duyarsızlığı	LH duyarsızlığı	17β-OH steroid red. eksikliği	17α-hidroksilaz eksikliği	Testosteron sentez kusuru	LH duyarsızlığı	LH duyarsızlığı

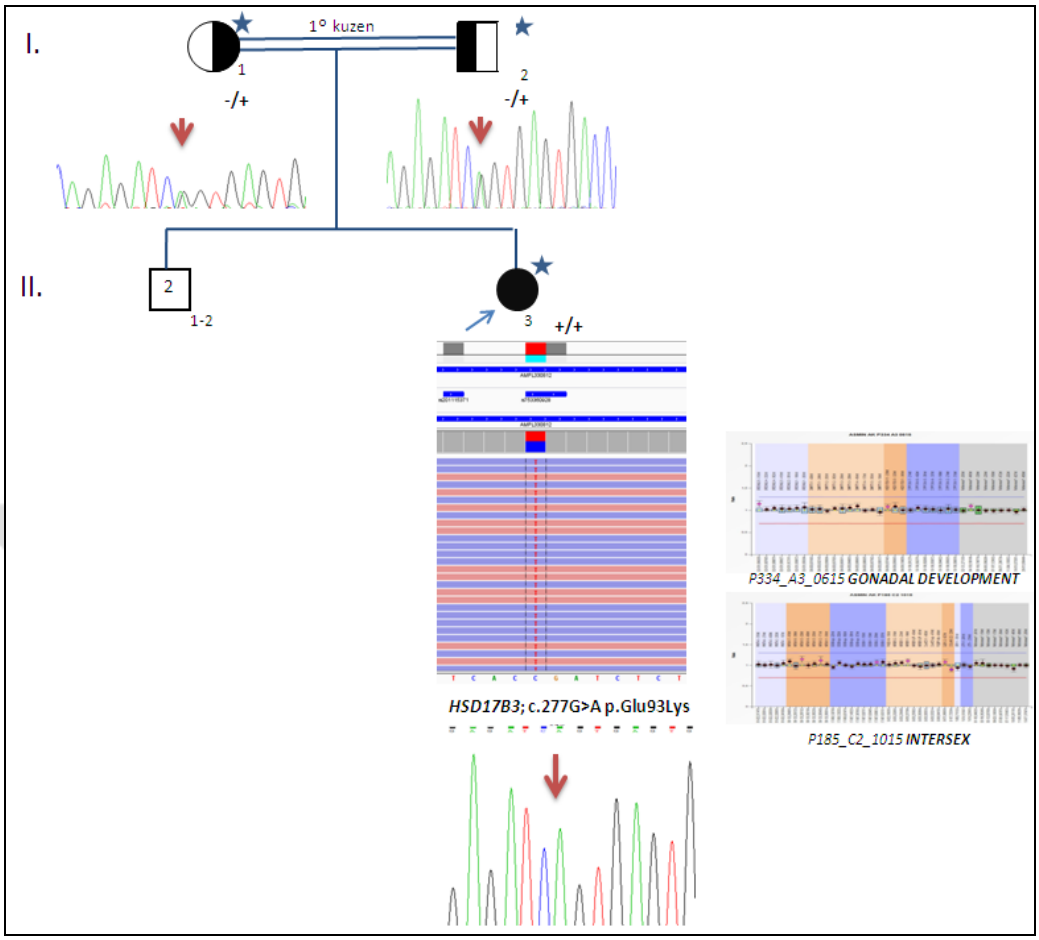
(devamı)

LH (mIU/ml)	0,6	0,1	27,95	1,55	29,3	1,1	0,115	0,4	0,1	0,147
FSH (mIU/ml)	2,6	1	25,42	11,42	18,4	4,4	2,66	1,47	0,3	1,3
Testosteron (ng/ml)	0,03	0,03	1,2	0,42	0,03	<0,02	0,03	0,26	1,70	0,03
17-OH PG (ng/ml)	1,37	1,9	1,5	8	0,76	0,7	19,5	1,17	4,3	-
Kortizol (µg/dl)	12,8	-	14,34	20		19,6	8	10,4	11,6	-
İnhibin-B (pg/dl)	222	-	155	286	75	130	-	92.0	373	147
AMH (ng/ml)	>44	-	34,72	>20	17,03	↓	27,5	2,0	-	-
Androstenedion (ng/ml)	4,18	0,42	9,45		0,40	0,48	0,2	0,482	0,4	-
Uyarılmış T (ng/ml)	0,09	0,17	-	<0,01	0,03	<0,02	-	0,58	<20	0,03
T/DHT	-	-	42	-	-	-	-	60	-	-
T/AS	-	<0,8	<0,8	<0,8	-	<0,8	-	8,3	4,9	-
Pelvik USG	Müller yapıları (-) Testis (+/+)	Müller yapıları (-) Testis (+/+)	Müller yapıları (+) Testis (+/+)	Müller yapıları (-) Testis (+/+)	Müller yapıları (-) Testis (+/+)	Müller yapıları (-) Testis (+/+)	Müller yapıları (-) Testis (+/+)	Testis (+/+)	Müller yapıları (-) Testis(+/-)	Müller yapıları (-) Testis (+/+)

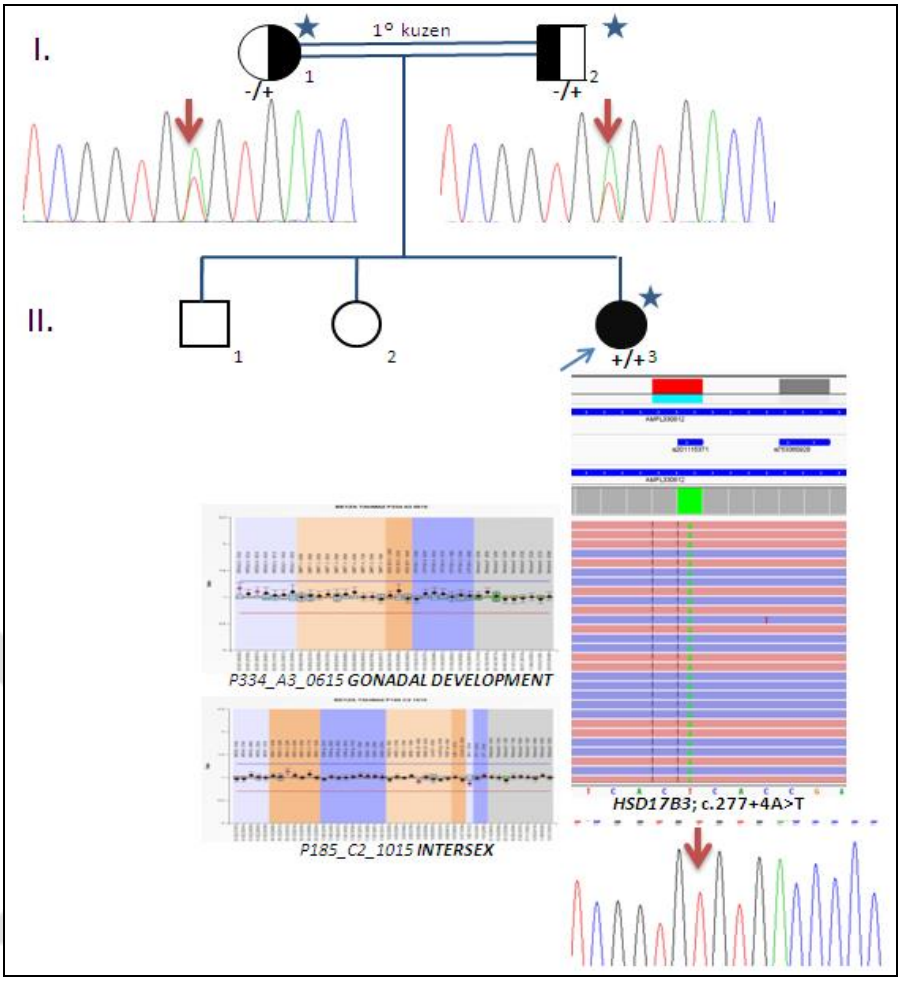
Tablo 4-5. 46,XY Androjen sentez bozukluğu olan olguların genetik analiz sonuçları.

		Olgu 7. (DSD#7)	Olgu 8. (DSD#8)	Olgu 9. (DSD#9)	Olgu 10. (DSD#10)	Olgu 11. (DSD#11)	Olgu 12. (DSD#12)	Olgu 13. (DSD#13)	Olgu 14. (DSD#14)	Olgu 15. (DSD#15)	Olgu 16. (DSD#16)
Karyotip		46,XY	46,XY	46,XY	46,XY	46,XY	46,XY	46,XY	46,XY	46,XY	46,XY
Gen		*HSD17B3*	*HSD17B3*	*HSD17B3*	*LHCGR*	*LHCGR*	*HSD17B3*	*POR*	*HSD17B3*	*HSD17B3*	*HSD17B3*
Referans transkipt		NM_000197.1	NM_000197.1	NM_000197.1	NM_000233.3	NM_000233.3	NM_000197.1	NM_000941.2	NM_000197.1	NM_000197.1	NM_000197.1
Ekzon		3	İntron 3	9	2	11	2	11	1 ve 10	İntron 10	2
Zigozite		Hom.	Hom.	Hom.	Hom.	Hom.	Hom.	Hom.	Birleşik Het.	Hom.	Hom.
Nükleotid		c.277G>A	c.277+4A>T	c.639_640insA	c.203C>T	c.1435C>T	c.167C>T	c.1196_1204dupCCTCGGAGC	c. [139A>G];[704T>C]	c.607-1G>A	c.182G>A
Protein		p.Glu93Lys	-	p.Glu214fs*4	p.Ala68Val	p.Arg479*	p.Ala56Val	p.Pro399_Gln401dup	p. [Met47Val;[Met235Thr]	-	p.Gly61Glu
id dbSNP / HGMD		CM173149	CS002140	-	-	CM163728	-	-	CM1616125; rs776757787	CS941501	
Varyantın sıklığı		-	-	-	TOPMED 0.00003/1	-	-	-	-; ExAC 0.00002/2	-	-
Referans		1	2	Bu çalışma	Bu çalışma	3	Bu çalışma	Bu çalışma	4; Bu çalışma	5	Bu çalışma
***In silico* analizler**	**Mutation Taster**	-	-	disease causing (1.0)	disease causing (0.99)	-	disease causing (0.99)	-	-; disease causing (0.99)	-	disease causing (0.99)
	PolyPhen-2 (Hum Var)	-	-	-	Probably damaging (0,99)	-	Probably damaging (0,99)	-	-; Probably damaging (0,98)	-	Probably damaging (1,0)
	Provean	-	-	-	Neutral	-	Deleterious	-	- ; Deleterious	-	Deleterious
	SIFT	-	-	-	Tolerated	-	Damaging	-	- ; Damaging	-	Damaging
MLPA	**P334 A3 (Gon.Dev)**	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	P185 C2 (Intersex)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

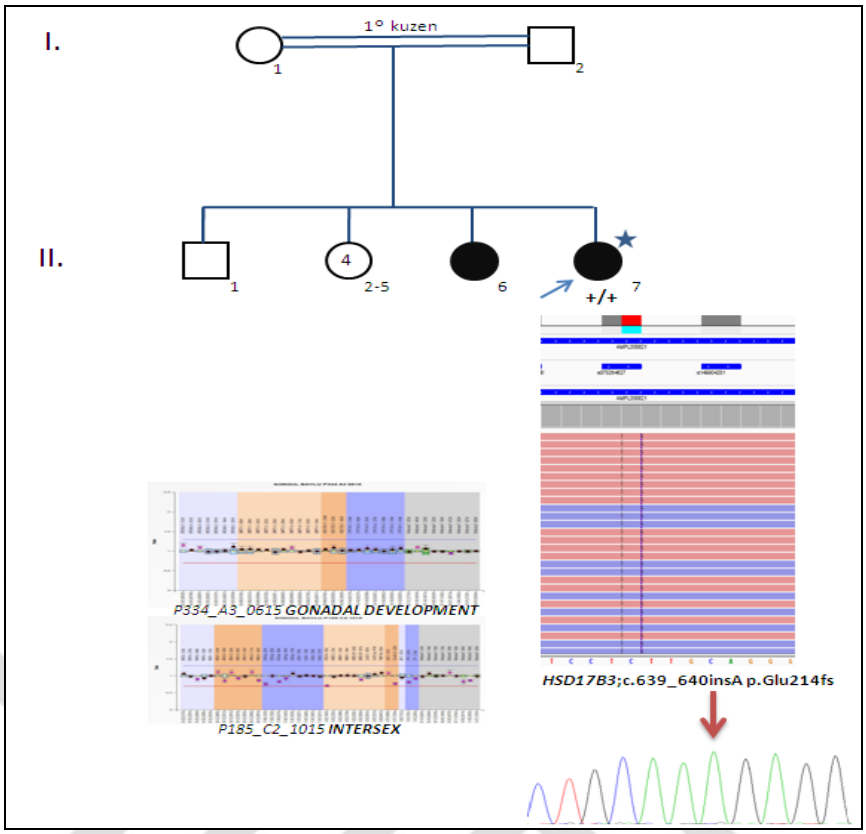
1. Özen (2017) *Horm Res Paediatr* 87: 81 PubMed: 27898418; **2.** Boehmer (1999) *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4713 PubMed: 10599740; **3.** Ben Hadj Hmida (2016) *Fertil Steril*PubMed: 27016457;**4.** Eggers (2016) *Genome Biol* 17: 243 PubMed: 27899157; **5.** Geissler (1994) *Nat Genet* 7: 34 PubMed: 807563



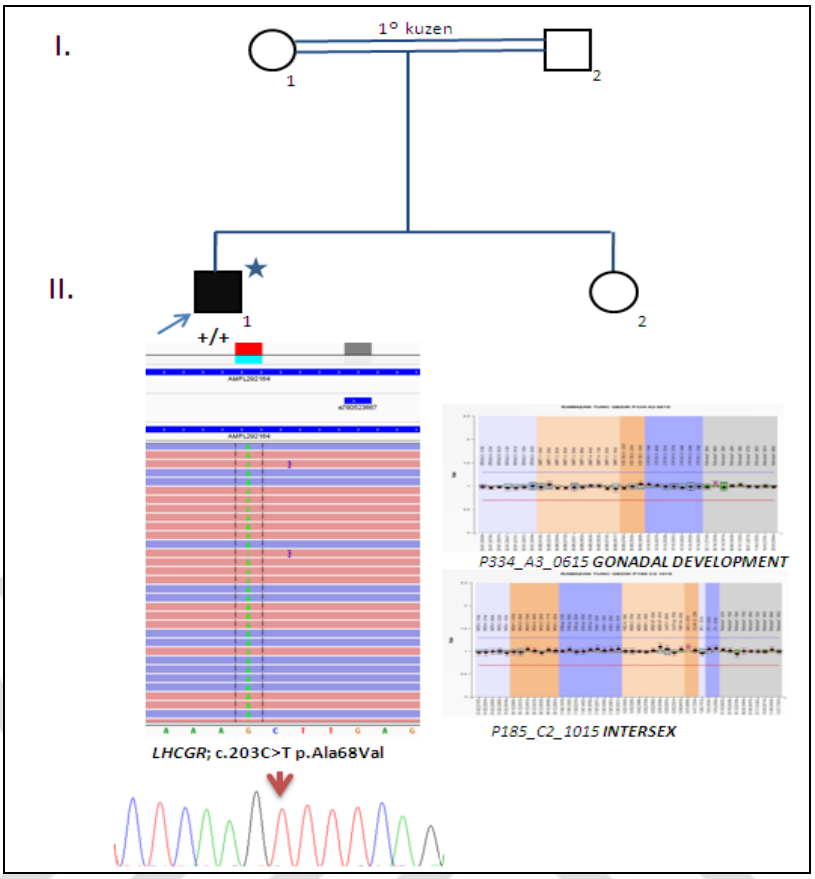
Aile(DSD#7): Aile ağacı, indeks (II-3)'e ait panel-gen testinde saptanan *HSD17B3* c.277G>A (p.Glu93Lys) homozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması, anne-babasında segregasyon analizi; indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri.



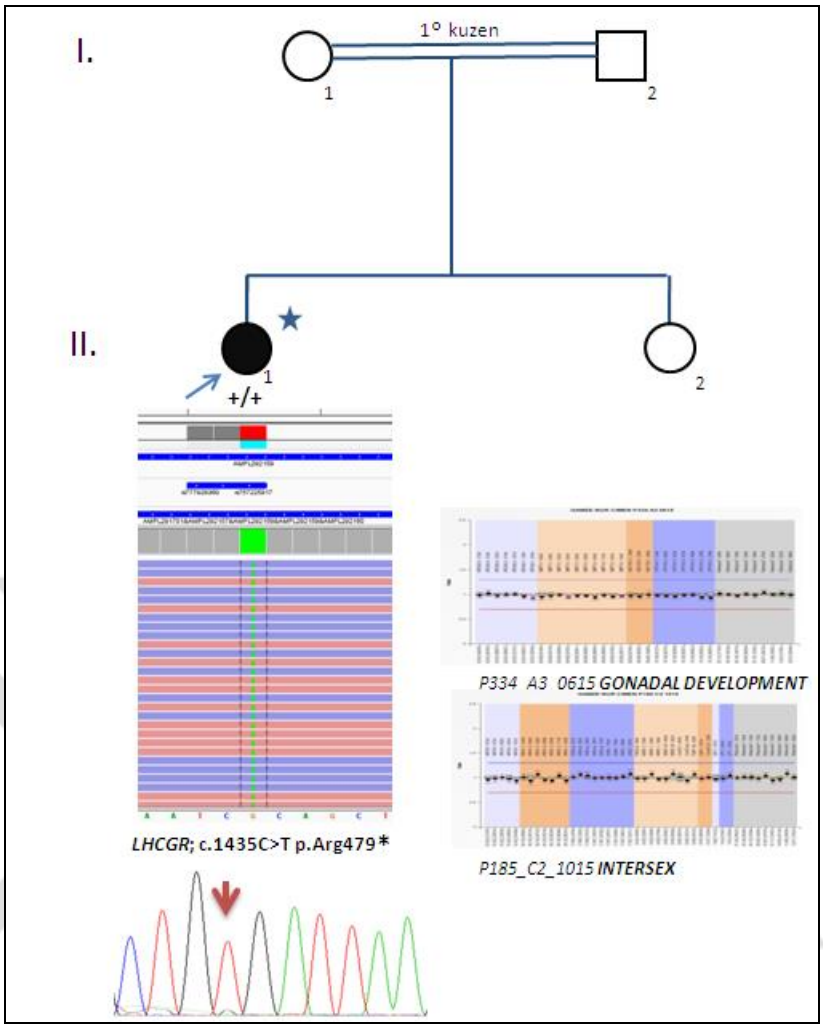
Aile (DSD#8): Aile ağacı, indeks (II-3)'e ait panel-gen testinde saptanan *HSD17B3* c.277+4A>T homozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması, anne-babasında segregasyon analizi; indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri



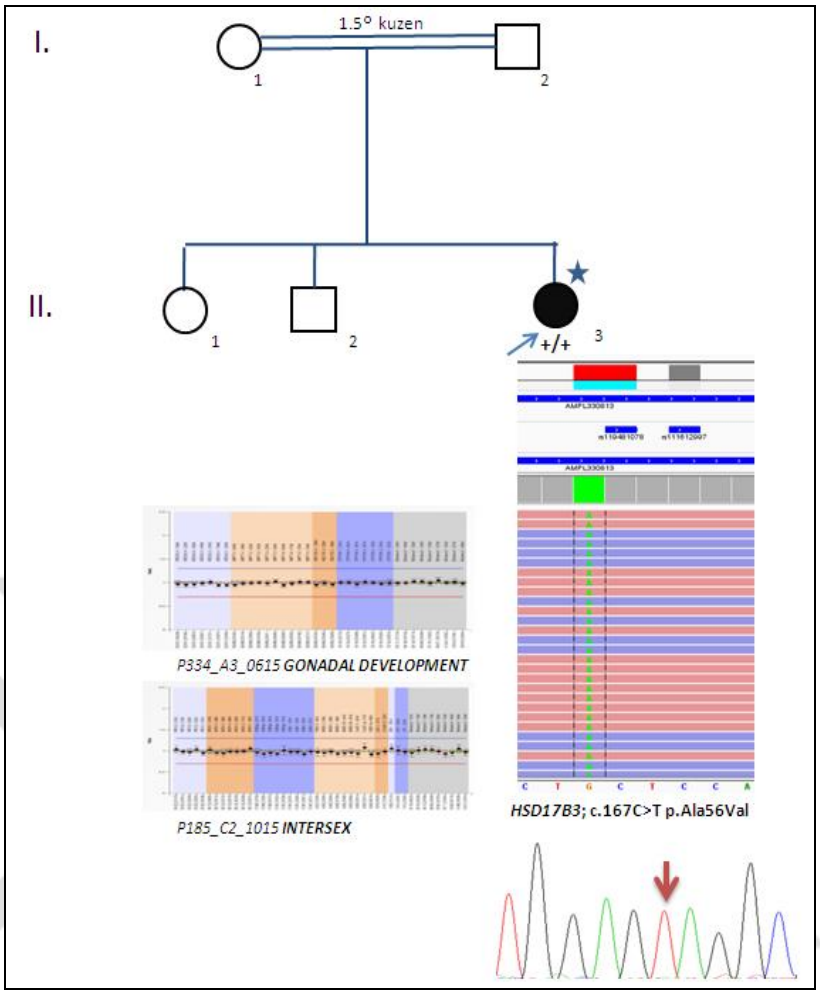
Aile (DSD#9): Aile ağacı, indeks (II-7)'e ait panel-gen testinde saptanan *HSD17B3* c.639_640insA (p.Glu214fs*) homozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri



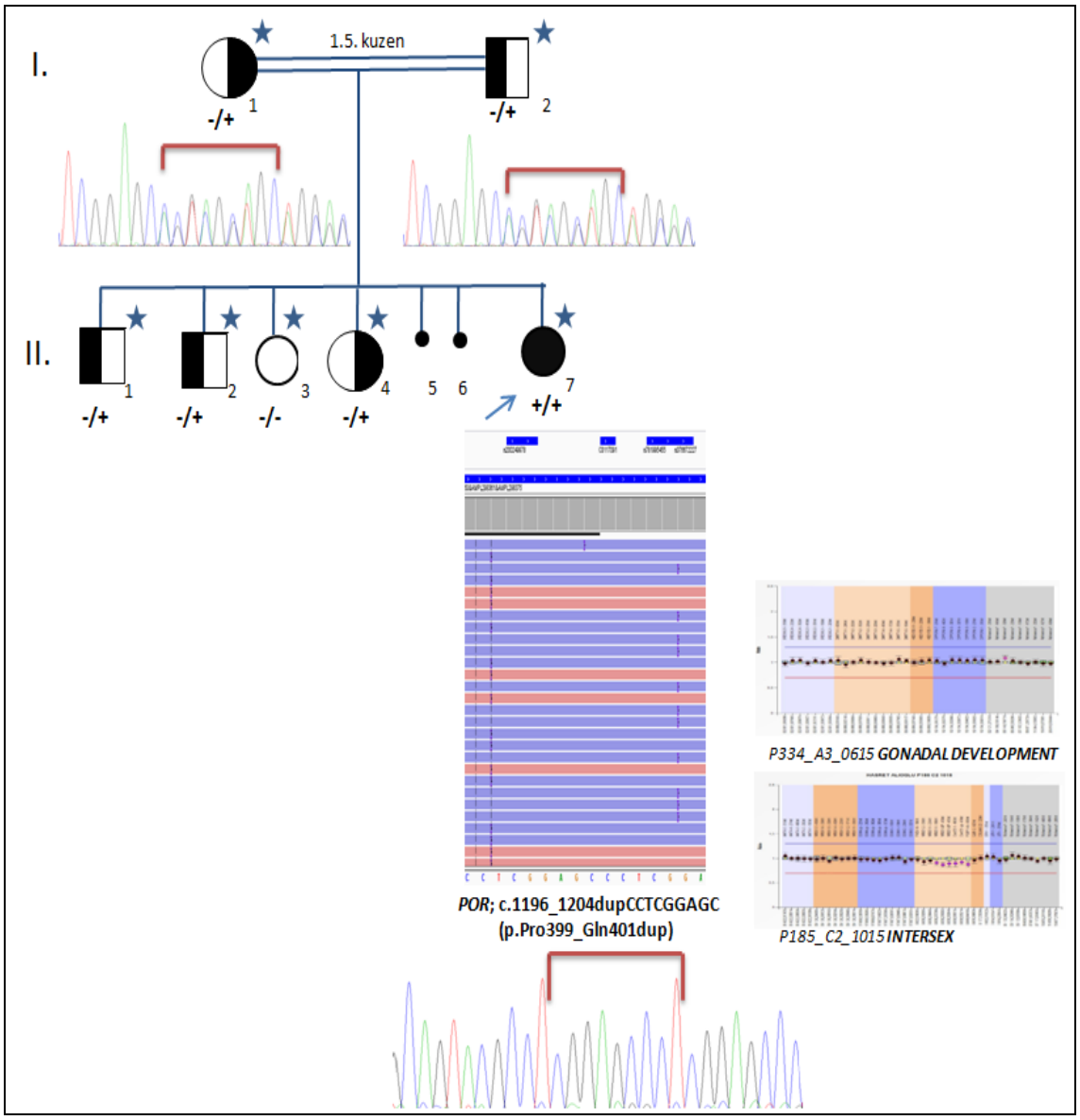
Aile (DSD#10): Aile ağacı, indeks (II-1)'e ait panel-gen testinde saptanan *LHCGR* c.203C>T (p.Ala68Val) homozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri



Aile (DSD#11): Aile ağacı, indeks (II-1)'e ait panel-gen testinde saptanan *LHCGR* c.1435C>T (p.Arg479*) homozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri



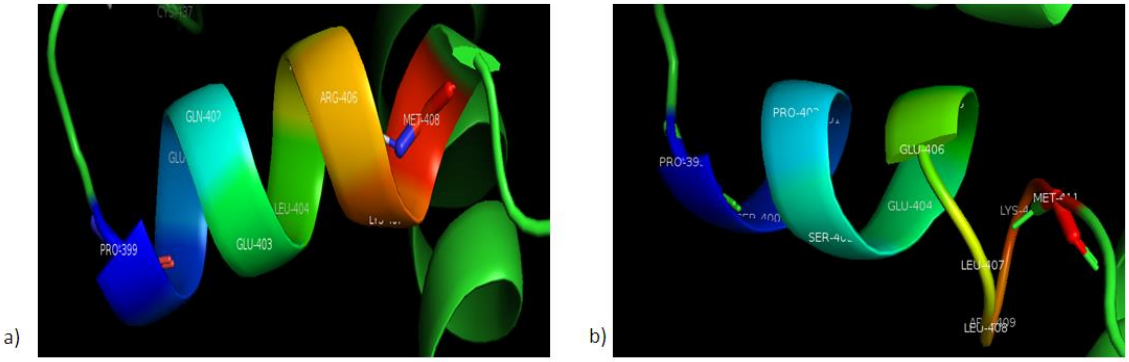
Aile (DSD#12): Aile ağacı, indeks (II-3)'e ait panel-gen testinde saptanan *HSD17B3* c.167C>T (p.Ala56Val) homozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri



Aile (DSD#13): Aile ağacı, indeks (II-7)'e ait panel-gen testinde saptanan *POR* c.1196_1204dupCCTCGGAGC (p.Pro399_Gln401dup) homozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; aile içi segregasyon analizi, indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri

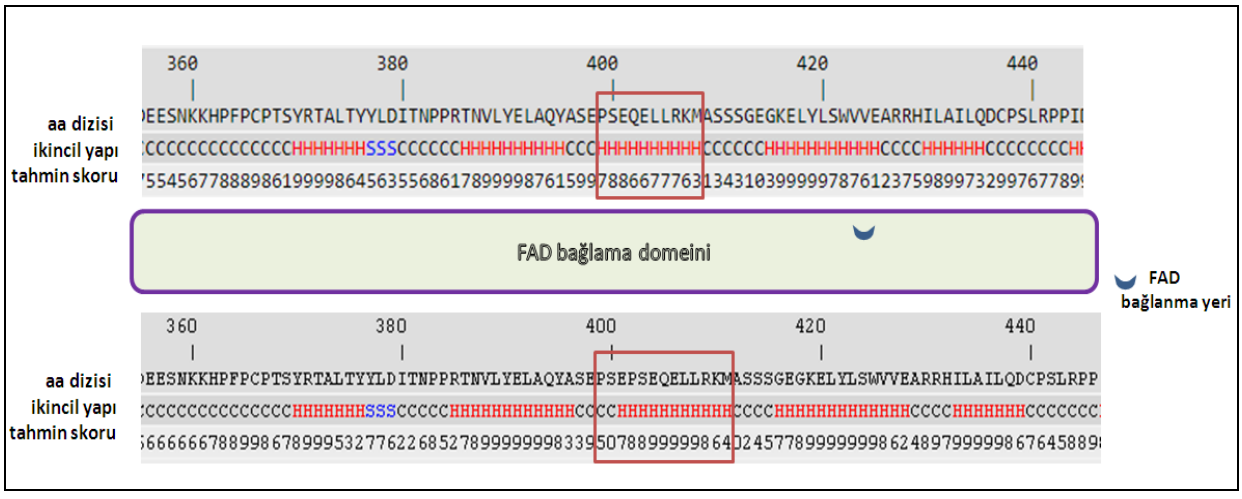
***POR* geninde saptanan yeni mutasyonun protein düzeyinde etkisinin *in silico* analizi**

in silico tahmin programı tarafından öngörülen modellerden yabanıl form için -0.60, mutant form için ise -0.54 güvenirlik skoruna sahip olanı analiz için seçildi ve PyMOL programında proteinin her iki formunun üç boyutlu yapısı görüntülendi.



Şekil 4-2. a)Yabanıl form proteinin FMN domeinindeki alfa-heliks (*p*P399-*p*M408) yapısının üç boyutlu yapısı b) Mutant proteinin (p.Pro399_Gln401dup) FMN domenindeki alfa heliksin üç boyutlu yapısı

Proteinin ikincil yapıları yabanıl ve mutant formlar için karşılaştırıldı.



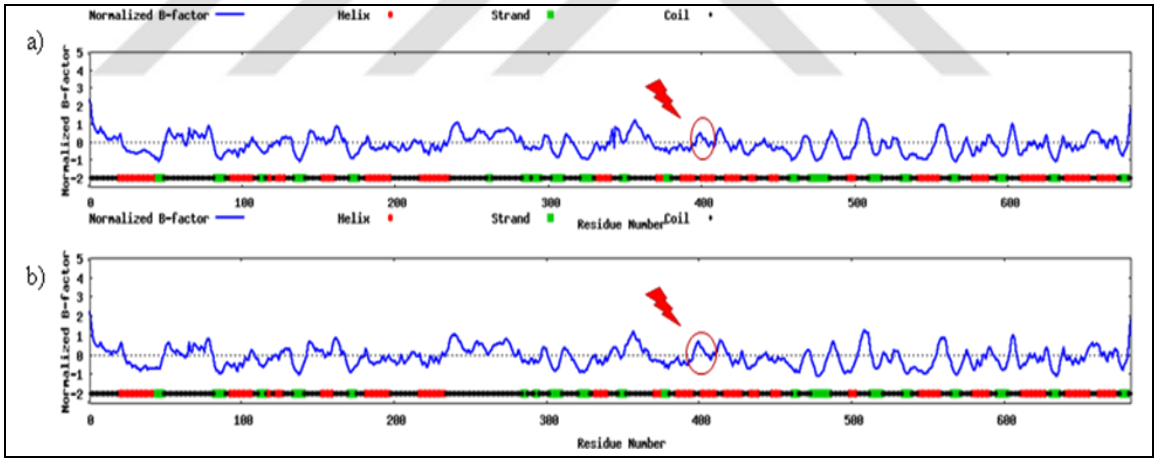
Şekil 4-3. Proteinin üst kısımda yabanıl ve alt kısımda mutant formlarının ikincil yapılarının analizi. (H: heliks, S: iplik, C: bobin sarmal yapı)

Proteinin çözünürlüğü yabanıl ve mutant formlar için karşılaştırıldı.

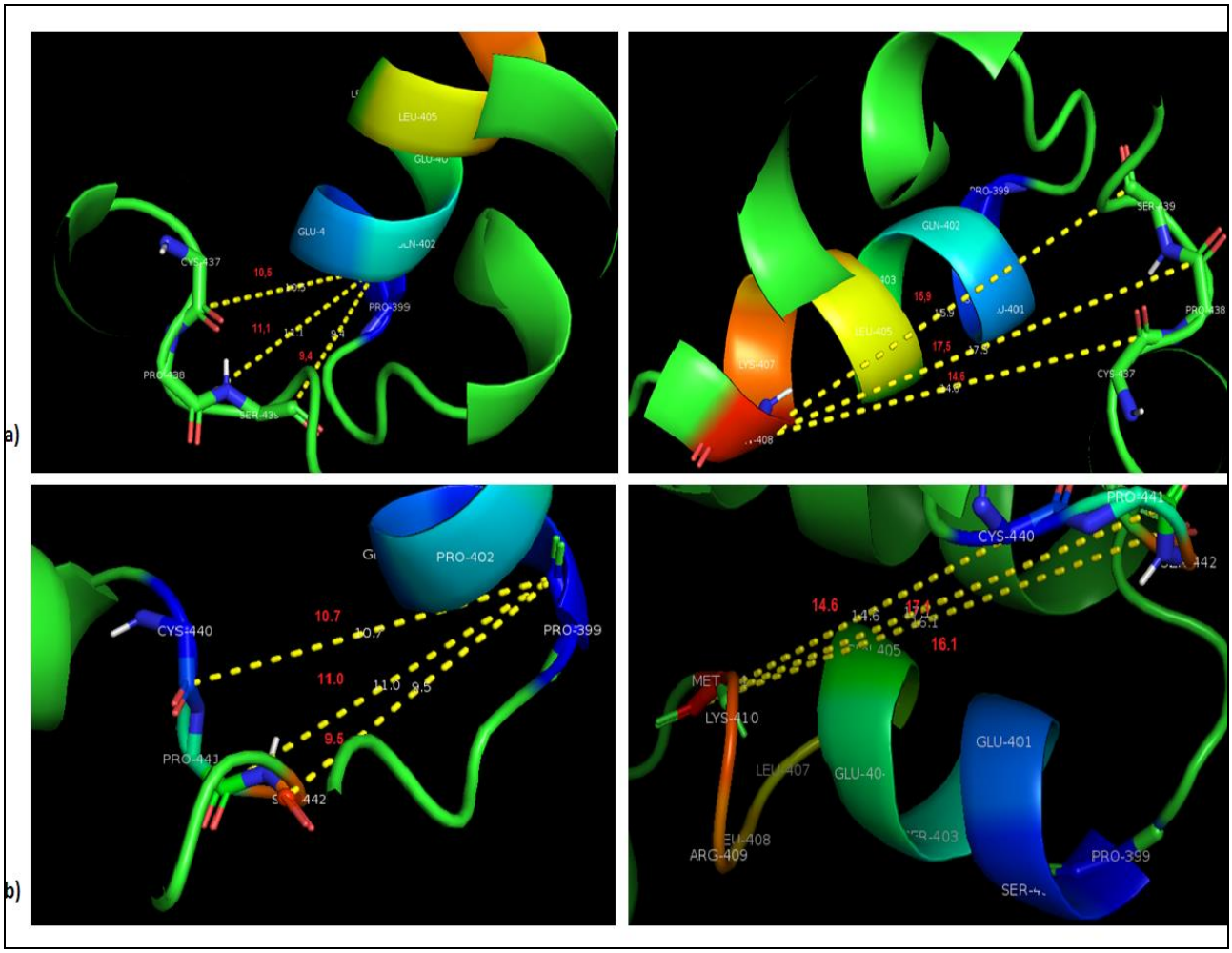


Şekil 4-4. Proteinin a) yabanıl ve b) mutant formlarının çözünürlüklerinin karşılaştırılması. (0 skoru membrana gömülü (hidrofobik) aminoasitleri, 9 skoru ise serbest (hidrofilik) olanları göstermektedir)

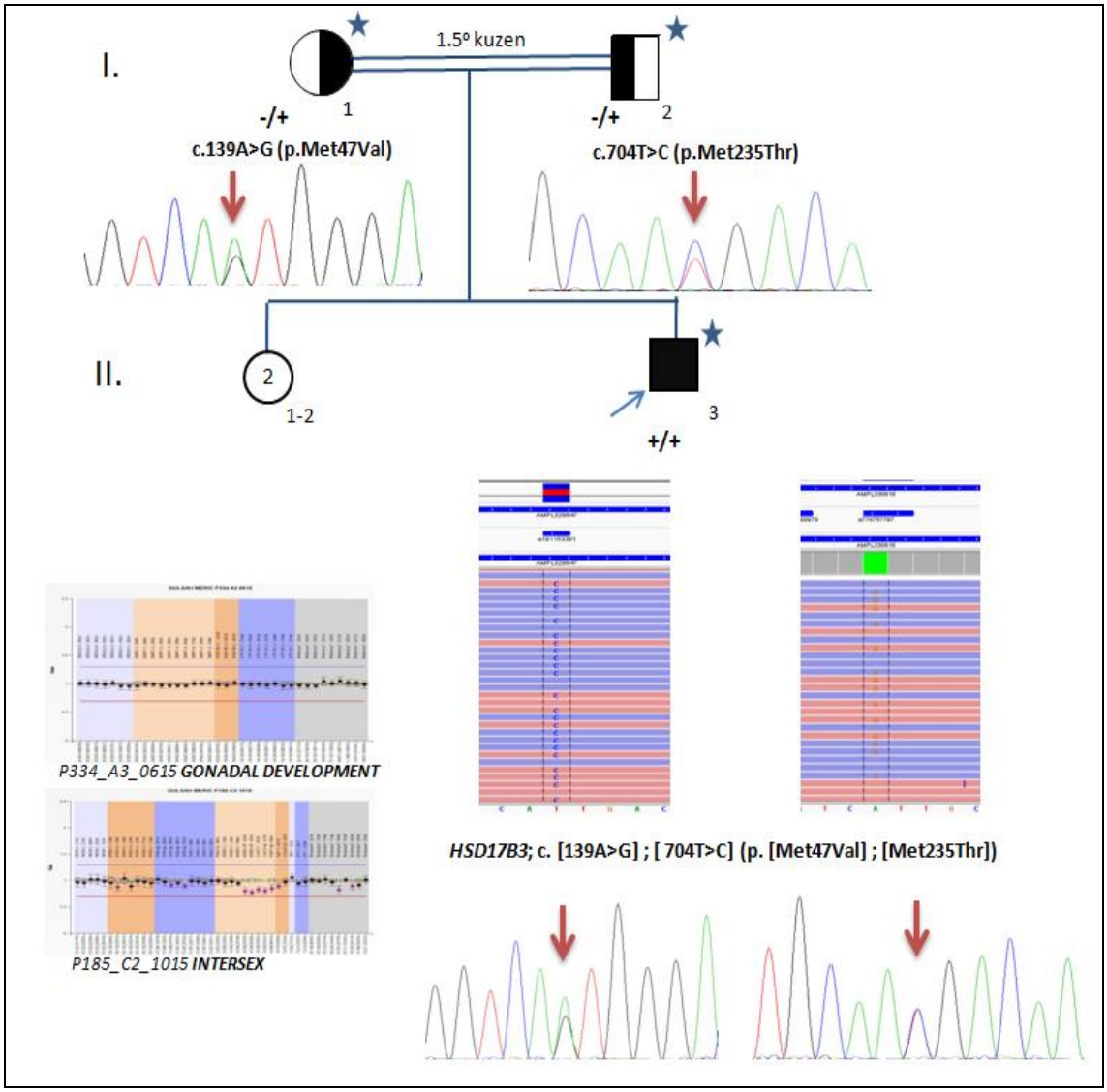
Proteinin termodinamik olarak termal devinimi (mobility) yabanıl ve mutant formlar için karşılaştırıldı.



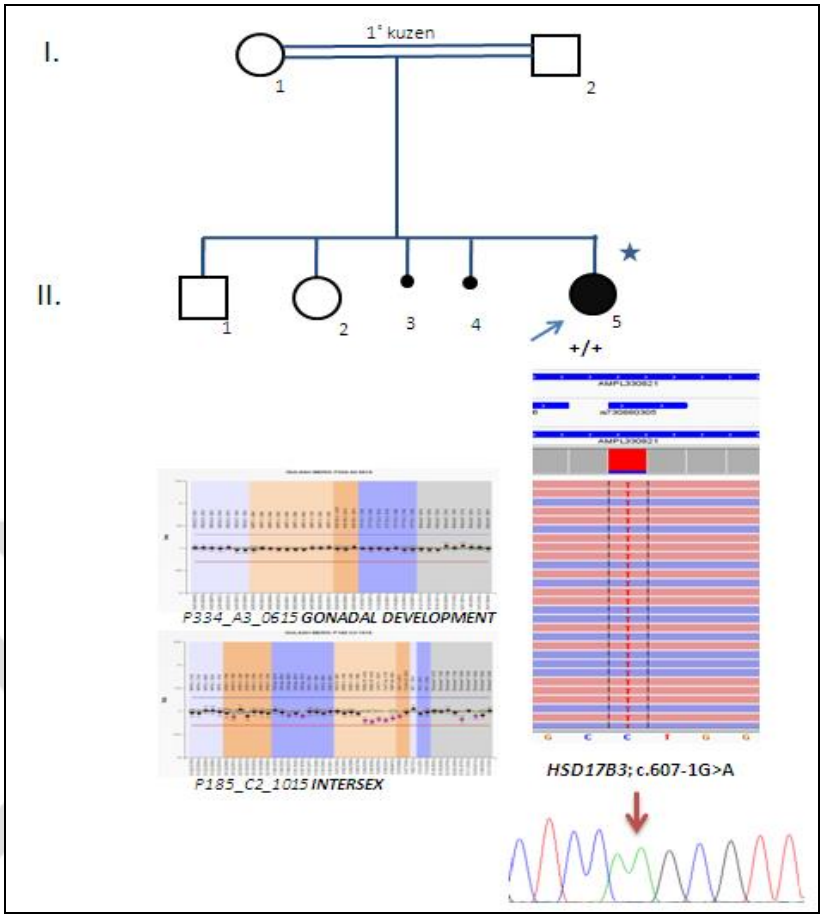
Şekil 4-5. Proteinin a) yabanıl ve b) mutant formlarının termal devinim açısından karşılaştırılması.



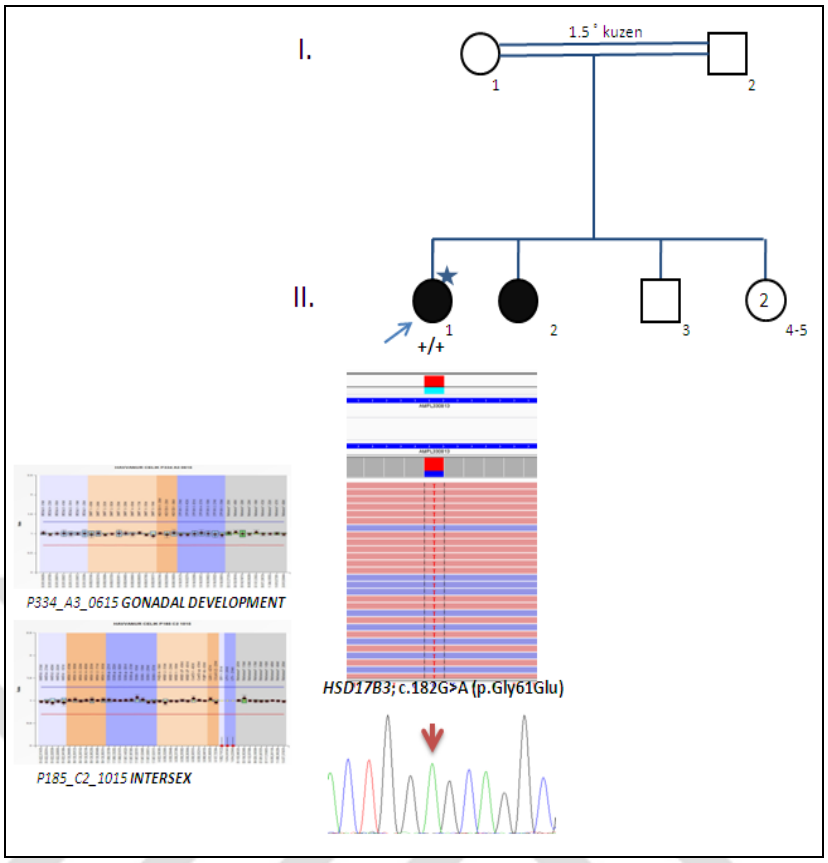
Şekil 4-6. Proteinin FAD domeininde alfa heliksin başlangıç ve bitiş aminoasitlerinin (*p*P399 ve *p*M408) C*α* atomları ile FAD domeininin kararlı üç boyutlu yapısının oluşumunda önemli olduğu bilinen *p*C437, *p*P438 ve *p*S439 aminoasitlerinin C*α* atomları arasındaki mesafenin yabanıl ve mutant proteinde ölçümü (Å).



Aile (DSD#14): Aile ağacı, indeks (II-3)'e ait panel-gen testinde saptanan *HSD17B3* c.[139A>G];[704T>C] (p. [Met47Val];[Met235Thr]) birleşik heterozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; aile içi segregasyon analizi, indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri



Aile (DSD#15): Aile ağacı, indeks (II-5)'e ait panel-gen testinde saptanan *HSD17B3* c.607-1G>A homozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri



Aile (DSD#16): Aile ağacı, indeks (II-1)'e ait panel-gen testinde saptanan *HSD17B3* c.182G>A (p.Gly61Glu) homozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri

4.2.1.3. İzole Kriptorşidizm, Hipospadias

Bu grupta tek olgunun (Olgu17) demografik, klinik, hormonal, görüntüleme bulguları Tablo 4.6*a*'da ve saptanan genetik varyantlar ve değerlendirilmeleri Tablo 4.6*b*'de topluca gösterildi. Olguya ait aile ağacı, YND temelli panel gen testi ile saptanan değişimin IGV görüntüsü ile Sanger doğrulama çalışmasının elektroferogram görüntüsü ve MLPA analiz görüntüsü olgu bazında gösterildi.

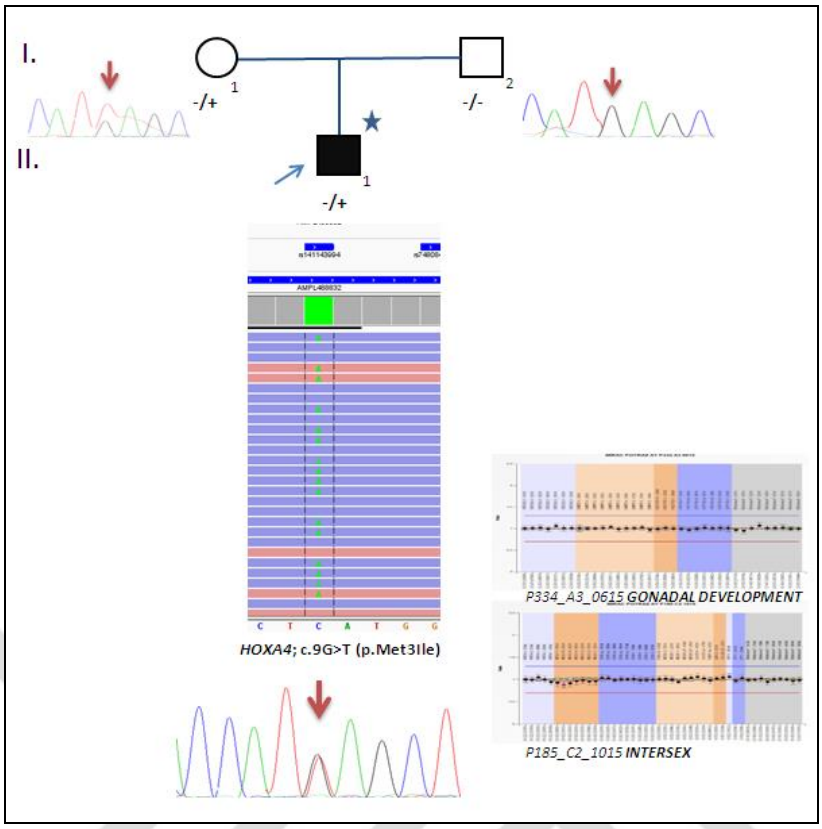
Tablo 4-6. 46,XY izole kriptorşidizm/hipospadias olan olgunun *a)* başvuru yaşındaki fizik muayene, hormonal ve görüntüleme bulguları *b)* genetik analiz sonucu

a)

Başvurudaki yaşı	YD
Başvuru nedeni	Bil.kriptorşidizm
Yetiştirilen cinsiyet	erkek
Akraba evliliği	yok
Ailede etkilenmiş olgu	yok
Ağırlık /SDS	15 (1,20)
Boy / SDS	95 (1,81)
Dismorfik / eşlik eden diğer sistem bulguları	Hafif yüksek damak, <6 cafe au lait lekeleri
Dış Genital	erkek
Fallus boyu	5 cm, fimozis
Hipospadias	penoskrotal
Testisler (sağ/sol)	-
EMS skoru	3
Gonadektomi	-
Histopatoloji	-
Ayırıcı tanı	Bil. kriptorşidizm
LH (mIU/ml)	0,35
FSH (mIU/ml)	1,66
Testosteron (ng/ml)	0,025
17-OH PG (ng/ml)	1,43
Kortizol (µg/dl)	6,09
İnhibin-B (pg/dl)	-
AMH (ng/ml)	-
Androstenedion (ng/ml)	<0,30
Uyarılmış T (ng/ml)	8,13
T/DHT	140
T/AS	-
Pelvik USG	Müller yapıları (-) Testis (+/-)

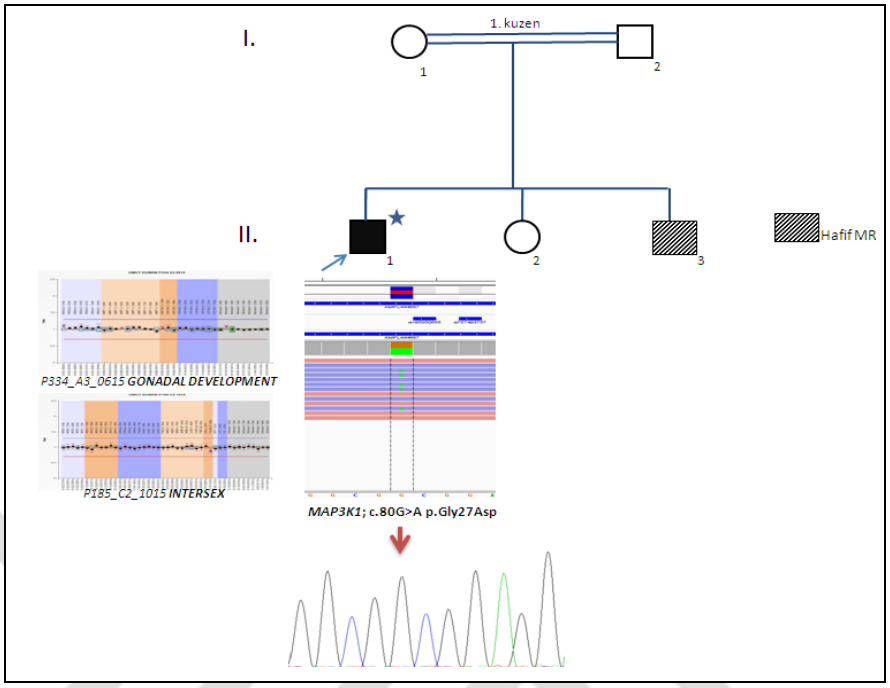
b)

Karyotip		46,XY
Gen		*HOXA4*
Referans transkipt		NM_002141.4
Ekzon		1
Zigozite		Het.
Nükleotid		c.9G>T
Protein		p.Met3Ile
id dbSNP / HGMD		rs141143994
Varyantın sıklığı		ExAC 0.0002/14 GO-ESP 0.00008/1
Referans		Bu çalışma
***In silico* analizler**	**Mutation Taster**	disease causing (0.99)
	PolyPhen-2 (Hum Var)	Probably damaging (0.98)
	Provean	deleterious
	SIFT	damaging
MLPA	**P334 A3 (Gon.Dev)**	N
	P185 C2 (Intersex)	N

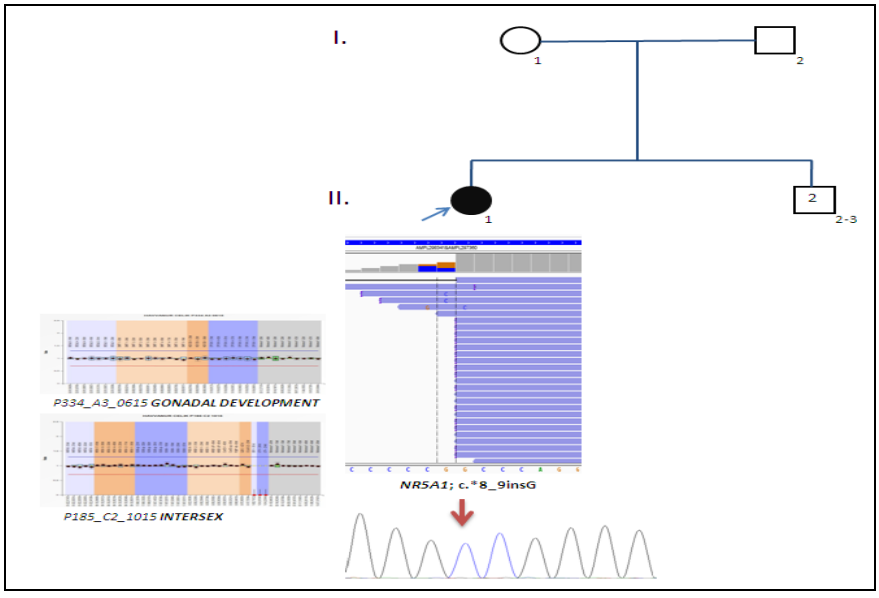


Aile (DSD#17): Aile ağacı, indeks (II-1)'e ait panel-gen testinde saptanan *HOXA4* c.9G>T (p.Met3Ile) heterozigot mutasyonunun IGV görüntüsü ve Sanger doğrulaması; aile içi segregasyon analizi, indekse ait MLPA (P334 A3 ve P185 C2 probları ile normal sonuç) analiz görüntüleri

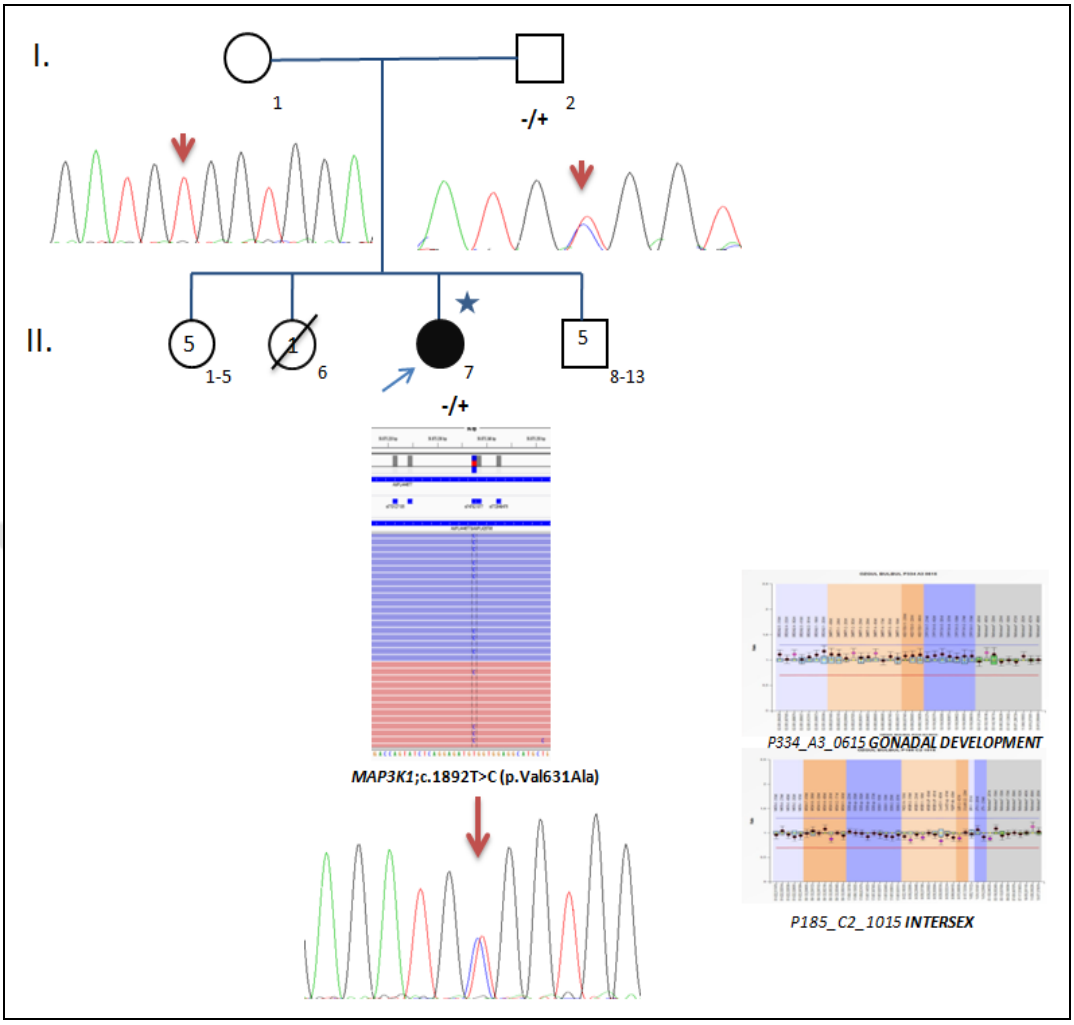
4.2.2. Sanger Dizileme Tekniği ile Doğrulanamayan ve Aile İçi Segregasyon Analizi İle Tesadüfi Olarak Değerlendirilen YND Sonuçları



SD ile doğrulanamayan olgu örneği (Olgu 22), panel-gen testinde saptanan *MAP3K1* c.80G>A (p.Gly27Asp) heterozigot değişimin IGV görüntüsü ve SD ile doğrulama çalışması



SD ile doğrulanamayan olgu örneği (Olgu 23), panel-gen testinde saptanan *NR5A1* c.*8_9insG değişimin IGV görüntüsü ve SD ile doğrulama çalışması



Olgu 18'de *MAP3K1* geninde ekzon 10'da heterozigot saptanan 1892T>C (p.Val631Ala, rs747821377) varyantı veritabanlarında çok nadir olarak bildirilmiştir (ExAc'de 60 306 bireyin birinde heterozigot) ve *in silico* analizlerinden PolyPhen "zararsız", SIFT "zaralı" tahmini vermektedir. Aile çalışmasında olgunun annesinde saptanmayan, sağlıklı baba da heterozigot olarak gösterilen bu değişim, hastalıkla segrege olmadığından tesadüfi nadir bir polimorfizm olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4-7. YND İle Mutasyon Saptanmayan Olgular

Olgu	Karyotip	Akrabalık	CGB ilişkili saptanan bulgular	Ek bulgular	YND öncesi tetkikler	Panel-gen testi sonucu *	*Ion Torrent* platformunda CNV analizi
18	46,XY	-	Tam gonadal disgenezi	yok	MLPA: *N*	*MAP3K1* c.1892T>C (p.Val631Ala) *het.*	N
19	46,XY	-	Bil. Kriptorşidizm A/T: Gonadal disgenezi	yok	MLPA: *N*	N	N [1]
20	46,XY	1° kuzen	Gecikmiş ergenlik, A/T: Ovotestiküler CGB	yok	MLPA: *N*	N	N
21	46,XY	-	Penoskrotal hipospadias, skrotal hiperpigmentasyon	yok	*AR* ve *SRD5A2* dizi: *N* MLPA: *N*	N	N
22	46,XY	1° kuzen	Primer gonadal yetmezlik, geç testiküler regresyon	yok	MLPA: *N*	N	N
23	46,XX	-	Kliteromegali, A/T: Ovotestiküler CGB	yok	MLPA: *N*	N	N
24	46,XY	2° kuzen	Penoskrotal hipospadias	yok	MLPA: *N*	N	N
25	46,XX	1° kuzen	A/T: Ovotestiküler CGB	yok	*SRY* dizi: *N* MLPA: *N*	*POR*c.461A>T (p.Asp154Val) *het.*	N [2]
26	46,XY	2° kuzen	LH duyarsızlığı, hipogonadotropik hipogonadizm	yok	*SRD5A2* dizi: *N* MLPA: *N*	N	N
27	46,XY	2° kuzen	Bifid skrotum, penoskrotal hipospadias, hidrosel	yok	*AR* ve *SRD5A2* dizi: *N* MLPA: *N*	N	N [1]
28	46,XY	-	Prematür adrenarş	FMF	MLPA: *N*	N	N
29	47,XXY	-	Penoskrotal hipospadias	yok	*AR* ve *SRD5A2* dizi: *N* MLPA: *N*	N	N
30	46,XY	-	Penoskrotal hipospadias	Fasiyal dismorfizm	*AR* dizi: *N* MLPA: *N*	N	N
31	46,XY	-	Penoskrotal hipospadias, mikropenis	yok	*AR* ve *SRD5A2* dizi: *N* MLPA: *N*	N	N

32	46,XY	2.5° kuzen	Penoskrotal hipospadias	yok	*AR* ve *SRD5A2* dizi: *N* MLPA: *N*	N	N
33	46,XY	-	Penoskrotal hipospadias		MLPA: *N*	N	N
34	46,XY	-	Penoskrotal hipospadias		*AR* ve *SRD5A2* dizi: *N* MLPA: *N*	N	N
35	46,XY	-	Penoskrotal hipospadias	Hipoglisemi, gastrik hemoraji, konvülziyon	*SRY* ve *SRD5A2* dizi: *N* MLPA: *N*	N	N [1]
36	46,XY	-	Glandüler hipospadias	Hipoglisemi, hipotiroidi	MLPA: *N*	N	N
37	46,XY	-	Mikropenis, hipospadias	yok	MLPA: *N*	N	N
38	46,XY	-	Penil hipospadias	yok	MLPA: *N*	N	N
39	46,XY	1° kuzen	Penoskrotal hipospadias	yok	*AR* dizi: *N* MLPA: *N*	N	N
40	46,XY	-	Penoskrotal hipospadias, sağ kriptorşidizm	yok	*AR* ve *SRD5A2* dizi: *N* MLPA: *N*	N	N
41	46,XY	-	Glandüler hipospadias, bifid skrotum	yok	*AR* ve *SRD5A2* dizi: *N* MLPA: *N*	N	N
42	46,XY	-	Penil hipospadias, kriptorşidizm	yok	*SRD5A2* dizi: *N* MLPA: *N*	N	N
43	46,XY	-	İnkomplet maskülinizasyon, bifid skrotum	YDD, sağ renal agenezi, ASD/VSD	MLPA: *N*	N	N
44	46,XY	-	Mikropenis, skrotal hipoplazi, kriptorşidizm	Hafif hipotoni, dismorfizm	MLPA: *N*	N	N

*****Panel-gen testinde mutasyon saptanmayan veya kalıtım modeli OR olup sadece tek allelde mutasyon gösterilen olgularda panel-gen testinin kapsamadığı alanda kalan önemli gen bölgeleri (*POR* ekzon 10, 12 ve 16; *MAP3K1* ekzon 1,4 ve 17; XX genotipli olgularda *WNT4* ekzon 1) Sanger Dizileme tekniği ile incelendi.

[1] Bu olgularda CNV analizi sonucunda *CBX2* (17q25.3) geninde 6.923 kb'lik (*GRCh38*: 79778163-79785086)x1 heterozigot delesyon saptanmış, kalıtımla uyumlu olmadığı ve veritabanlarındaki inceleme sonucunda "zararsız" değişim olarak değerlendirilmiştir.

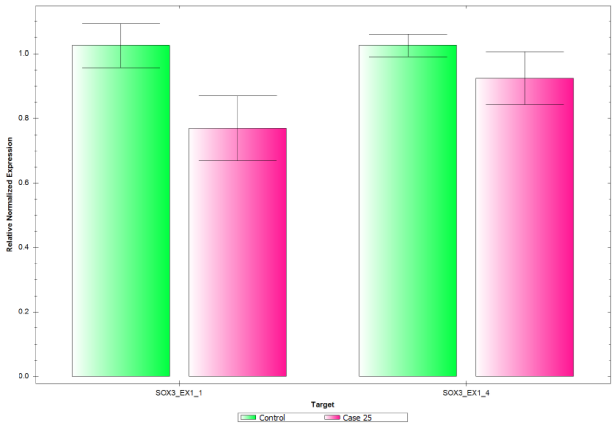
[2]Bu olguda CNV analizi sonucunda *SOX3* (Xq27.1) geninde 1.473 kb'lik (*GRCh38*: 140503615-140505088)x1 heterozigot delesyonu saptanmış, gerçek zamanlı PZR ile yapılan doğrulama çalışmasında herhangi bir kopya sayı değişimi bulunamamıştır (**Şekil 4-7**).

a)



Confidence filter: 10
MAPD filter: 0,3

b)



Şekil 4-7. a) *Ion Reporter* CNV analizi sonucunun IGV görünümü, b) Doğrulama çalışması, gerçek zamanlı PZR çalışması ΔΔCT analiz görünümü (Olgu 25).

5. TARTIŞMA

Cinsiyet gelişim bozuklukları (CGB) tek gen veya kromozomal anomalilere bağlı olarak gonadal ve anatomik cinsiyetin uyumsuz olarak geliştiği konjenital durumları tanımlamakta olup, tüm yenidoğanların %1.7'de görülmektedir. Hafif hipospadiasdan şüpheli genital yapıya ve gonad gelişim anomalilerine bağlı tam cinsiyet dönüşümüne kadar geniş spektrumda gözlenir ve insidansı 1/5500 olarak bildirilmektedir. Ayrıca hipospadias, kriptorşidizm, mikropenis ve belirgin dişi dış genital yapısına rağmen virilizasyon görülen olgular da göz önüne alındığında sıklık artmaktadır. Yeni sınıflandırmaya göre 46,XX CGB, 46,XY CGB ve cinsiyet kromozom anomalilerine bağlı CGB olmak üzere tanımlanmıştır. Cinsiyetin anormal gelişimi, gonadal gelişim bozukluğuna, androjen sentezi veya etkisindeki bozukluklara, çevresel faktörlerin de içinde yer aldığı birçok nedene bağlıdır. CGB'ler yenidoğanın acil sorunları arasında yer almakta olup, erken tanı yaşam kalitesi, ruhsal durum ve genetik danışma açısından önem taşır. Kuşkulu dış genital yapı ile doğan bebeklerde cinsel kimliğin belirlenmesinde dış genital görünümün yanı sıra kromozomal cinsiyet, gonadların over veya testis yönünde farklılaşmış olması, iç genital yapı, hormonların salgılanması ve etkisinin araştırılması önemlidir.

46,XY karyotip kuruluşu olan yenidoğanların yaklaşık 1/300'de dış genitalyanın gelişiminde kusur vardır ve %80'i erkek olarak yetiştirilir. Bu olguların yaklaşık %50'sinde ise hipospadias görülmektedir (201). 46,XY CGB'lerine ve gonadal gelişim bozukluğuna yol açtığı bilinen birçok tek gen ve kromozomal mutasyonlar tanımlanmıştır. *WT1, NR5A1, SRY, SOX9, ARX, ATRX* genlerindeki mutasyonlar disgenetik testis gelişimine neden olmanın yanı sıra WAGR, Denys-Drash, Kampomelik Displazi, alfa talasemi - mental retardasyon gibi sendromlara da neden olmaktadır. *DAX1* ve *WNT4* genleri içeren duplikasyonların hem disgenetik gonad gelişimine hem de mental retardasyona sebep olduğu bilinmektedir. Gonadlarda gelişim bozukluğuna yol açmadan iç ve/veya dış genital organlarda anatomik kusurlarla kendini gösteren Smith-Lemli-Opitz, Persistan Müller Kanal, Robinow, Aarskog ve popliteal pterygium sendromları da 46,XY CGB sebepleri arasındadır (202).

46,XX CGB'lerin en yaygın genetik nedeni ise 21-hidroksilaz eksikliğine bağlı KAH'dır. *SRY* genini içeren translokasyonlar, *SOX9* ve *RSPO1* genlerini içine alan duplikasyonlar ve nokta mutasyonları, MURCS (Mülleriyan agenezi, renal ve serviko-torsikal vertebra anomalileri), McKusick Kaufman ve kloaka anomalileri 46, XX CGB nedenlerine örnek olarak gösterilebilir (129).

CGB ilişkili genlerin büyük çoğunluğu DNA dizi analizi ile saptanabilen mutasyonlar (yanlış anlamlı, anlamsız, küçük del/dup, kırpılma hatası) olsa da, literatürde *DMRT1, FGF9, NR0B1, NR5A1, SOX3, SOX9, SRY* ve *WT1* genlerinde büyük delesyon ve duplikasyonlar da gösterilmiştir (203). Büyük delesyon tipi mutasyonlar homozigot formda PZR ürünü vermemesi sonucu indirekt olarak tahmin edilse de, günümüzde bu tip mutasyonlar gerçek zamanlı PZR, MLPA, microarray, FISH gibi farklı yöntemlerle gösterilebilmektedir. Dizi kapsamındaki bölgelerde büyük delesyon/duplikasyon gibi yapısal anomalilerin YND analizi sürecinde saptanabilmesi için, uygun kontrol örneği verilerinden oluşturulan referans kullanılarak istatistiksel hesaplamaya dayalı karşılaştırma çalışmaları ile kopya sayı varyant (CNV) farklılıklarını gösterebilen yeni biyoinformatik analiz yöntemleri geliştirilmektedir.

Bu tezinamacı, non-sendromik CGB bulgusu olan olgu grubumuzda tanı amaçlı hedef genlerin YND tabanlı özgün tasarlanmış panel-gen testi ile dizilenmesinin, büyük delesyon/duplikasyonların araştırılmasında MLPA yöntemi ve YND dizileme ile elde edilen verilerle yapılan CNV analizlerinin etkinliğini araştırmaktır.

Bu kapsamda, non-sendromik CGB ilişkili genlerin kodlayan bölgelerini ve ekzon-intron sınırlarını kapsayan YND tabanlı panel-gen testinden elde edilen verilerin değerlendirilmesi, klinik önemi olduğu düşünülenlerin özgün primerler tasarlanarak Sanger dizi ile doğrulanması, olanaklı olan ailelerde segregasyon analiz sonuçlarının irdelenmesi, herhangi bir mutasyon/varyant ilişkisi saptanmayanlarda panelin tasarım gereği kapsam dışı bıraktığı bölgelerin özgün tasarlanan primerler kullanılarak Sanger dizileme ile incelenmesi gerçekleştirildi. Fenotiple ilişkisi bilinen 15 farklı gendeki olası büyük delesyon ve duplikasyonlar için kullanılan MLPA yönteminin moleküler tanıya katkısı değerlendirildi. YND platformununhedeflenen tüm genler için CNV analizlerindeki etkinliği araştırıldı. Ayrıca yeni kodlayan bölge mutasyonlarının, üç boyutlu simülasyon modelleme ile protein yapısında oluşması beklenen yapısal farklılıklar incelendi. CGB'nin moleküler genetik tanısında, SD yöntemi ile her bir genin tek tek dizilenmesi yüksek maliyetli ve teknik açıdan uzun sürmesi nedeniyle tercih edilmemektedir. Genetik heterojenite (genetik etiyolojisinde çoklu genin sorumlu olması) gösteren hastalıklarda veya büyük genlerin incelenmesi gerektiği durumlarda hızlı tanı ve uygun maliyet sağlaması açısından YND teknolojisi uygun yaklaşımdır. YND teknolojisi, düşük oranlı mozaisizmleri de tanıma olanağı avantajı verirken, kütüphanenin hazırlanması ve biyoinformatik analizlerin tasarımına bağlı olarak daha büyük yapısal anomalileri saptama özelliği değişkenlik göstermektedir. Bu yöntemle tekrar dizi bölgelerindeki artışlar, tek yönlü ve düşük kapsamda dizilenmiş bölgelerdeki varyantların saptanamaması tekniğin duyarlılığını düşürmektedir. YND tekniği kulanılarak

yapılan tanı testlerinde belirli sayıda örnekle yapılan validasyon çalışmaları sonuçların doğruluğu açısından önemlidir (204). YND çalışmasında kullanılan panelin validasyon çalışmaları tamamlanmamış olduğundan saptanan tüm ilişkili varyantlar, özellikle düşük okuma bölgelerindeki patojenik olma şüphesi olan varyantların ve indel'lerin mutlaka SD ile doğrulanması gerekir. Nitekim çalışmamızda iki olguda YND ile saptanan iki farklı değişim SD ile doğrulanamamıştır. Bu değişimlerden biri *MAP3K1* geninde YND çalışmasında ekzon 1'de c.80G>A değişimi idi ve veritabanlarında daha önce tanımlanmamış ancak, *in silico* tahmin programlarının patojenik olarak değerlendirdiği bir değişimdi. SD ile doğrulanamayan bu değişimin panel-gen test sonuçları geriye dönük değerlendirildiğinde yalnızca geri okumalarda görüldüğü ve tüm diğer olgularla birlikte bu olguda da kalite skorunun düşük olduğu görüldü (Olgu 22). Saptanan mutasyon bölgesini kapsayan amplikon açısından panelin hassasiyetinin düşük olduğuna karar verildi. SD ile doğrulanamayan diğer değişim *NR5A1* geninde idi. YND çalışmasında 3'UTR da c.*8_9insG değişimi daha önce tanımlanmamıştı ancak, *in silico* tahmin programları patojenite lehine değerlendirmekteydi. Çünkü 3'UTR mutasyonları genel olarak mRNA stabilitesini bozmakta, miRNA bağlanma noktasını ortadan kaldırabilmekte veya yeni bir nokta oluşturabilmekte, translasyonu kontrol eden proteinlerin bağlanma yerlerini bozabilmekte ve böylece gen anlatımını etkileyebilmektedir. SD ile doğrulanmayan bu bulgunun IGV görüntüsü tekrar incelendiğinde geri okumalarda insersiyon olarak görülen G bazının aslında varolan okuma çerçevesinde bulunduğu, ancak düşük okuma ve haritalama sonrası kalite değerlendirilirken varyant değerlendirme parametrelerini geçemeyen bazların kırpılması nedeniyle bu şekilde gösterildiği belirlendi (Olgu 23). İlgili bölge için okuma ve kalite düşüklüğünün diğer olgularda bulunmadığı panelin etkinliğinin olgu bazında sapma gösterdiğine karar verildi.

SD ile doğrulanamayan bu iki olgu, YND analizlerinde görülen ve özellikle daha önce hastalık ilişkili mutasyon olarak tanımlanmamış değişimlerin *in silico* analiz programlarında patojenik olarak değerlendirilse dahi mutlaka SD doğrulanması gerektiğini göstermektedir.

Bilinen genlerde saptanan yeni değişimlerin doğrulama çalışmalarında kalıtım modeli ve değişimin tipine bağlı olarak aile çalışması da gerekmektedir. YND ile saptanan varyantların hastalık ilişkili olup olmadığının değerlendirilmesi veritabanları ve güncel literatürün yardımıyla bile kolay olmayabilir, günümüzde varyantların büyük bir çoğunluğu net bir patojenliği olmayan, veritabanlarında daha önceden rapor edilmemiş, önemi bilinmeyen varyantlar (VUS, variant of unkonwn significance) olarak sınıflandırılır. Aile içi ko-segregasyon çalışmaları, bu varyantların yorumlanmasına katkı sağlayabilmektedir. Çalışmamızda bir olguda saptanan nadir değişim, aile içi ko-segregasyon çalışmasının

önemini göstermektedir. *MAP3K1* geninde YND çalışmasında ekzon 10'da saptanan c.1892T>C (p.Val631Ala) heterozigot değişimi daha önce tanımlanmamış bir değişim idi ve *in silico* tahmin programları patojenik lehine değerlendirmekteydi. *MAP3K1* genindeki heterozigot fonksiyon kazanımına neden olan kırpılma hatası, yanlış anlamlı ve çerçeve kaymasına neden olmayan delesyon mutasyonları 46, XY CGB ile ilişkilendirilmiş, tam veya kısmi gonadal disgenezili olgularda bildirilmiştir(193). Aile çalışmasında olgunun babasında (Olgu 18) da aynı değişimin heterozigot olarak görülmesi bu değişimin zararsız ve tesadüfi olduğunu göstermiştir.

CGB olgularında yayınlanmış büyük delesyon ve duplikasyonların varlığı MLPA tekniğinin de tanısal yaklaşımda önemli olduğunu göstermektedir. Bugüne kadar *NR0B1*'da tüm gen (205), *NR5A1*'da kısmi gen (206), *SOX9*'da testis spesifik regülatör bölenin (RevSex) (207)ve bu genin ikinci uç bölgesinin (XYSR) duplikasyonları (133) gibi yapısal anomaliler bildirilmiş bulunmaktadır.

Tannour ve ark.'nın (2010) çalışmasında 46, XX ve 46, XY CGB olguları CGH-array yöntemi ile incelenmiş ve olguların %21.5 de fenotipten sorumlu aday CNV'ler saptanmıştır (208). *Ledig ve ark.*'nın (2010) a-CGH çalışmasında ise 87 46,XY gonadal disgenezili olgu grubunda tanı oranı %30 olarak bildirilmiştir (209). Array çalışmaları ile *SUPT3H, C2ORF80, KANK1, ADCY2* ve *ZEB2* genlerinin CNV için yeni aday genler olduğu, sendromik bulguların eşlik ettiği CGB olgularında array-CGH veya SNP-array tekniklerinin ilk basamak testi olarak uygulanması ve bu aşamada tanı oranının yaklaşık %30 olduğu bildirilmiştir (209,210). Çalışmamızda büyük delesyonların ve duplikasyonların incelenmesinde MLPA tekniği kullanıldı ancak bu teknik hedefe yönelik olduğundan ve çalışmada kullanılan ticari kitte bulunan probların sadece 15 genin belli bölgelerini tarama imkanı sağladığından olgu grubumuzda herhangi bir patojenik CNV saptanmadı. Olgularımızdaki olası CNV'ler bir diğer teknik olarak, *IonTorrent* platformunda yapılan YND verileri kullanılarak CNV analiz metodu ile araştırıldı. Geniş hassasiyetli kopya sayısı değişimlerini saptamak amacı ile yanlış pozitif sonuçlar göz önüne alınarak düşük filtreleme ile yapılan CNV analizinde,güvenlik skoru 10, MAPD skoru 0,3 filtreleme seviyesi temel alınarak yapılan analizlerde bir olguda fenotiple ilişkili olabileceği düşünülen (211) *SOX3* geninde (*GRCh38*:140503615-140505088)x1) 7 amplikonun dahil olduğu 1.373 kb'lik heterozigot delesyon saptandı. 46,XX kromozom kuruluşu olan olguda (Olgu 25) saptananbu değişim gerçek-zamanlı PZR ile doğrulanamadı. Bu durum, referans olarak kullanılan olgu sayısının az olması veanalizde kullanılan amplikon sayısının kısıtlı olması ve düşük filtreleme skoru ile saptanan yalnış pozitiflik olarak açıklanabilir. YND çalışmalarında KSV

analizlerinin istatistiksel hassasiyeti, karşılatırılan amplikon sayısı ve del/dup oluşan bölgedeki amplikon sayısı ile doğru orantılı olarak arttığı bildirilmektedir (212).

Array analizleri literatürde belirtildiği CGB olgularında ilk basamak test olabileceği gibi, YND ile mutasyon saptanmayan olguların, bir sonraki aşamada incelenmesi için de uygun bir yaklaşım olabilir. Array analizlerinin kromozom analizlerine göre yüksek olan maliyeti göz önünde bulundurulduğunda olguların ilk aşamada kromozom anomalileri açısından incelenmesi, klasik sitogenetik yöntemlerle saptanabilen mikroskobik yapısal değişimlerin incelenmesi ülkemiz koşullarına uygun görünmektedir. Array analizlerinin ekonomik ya da teknik gerekçelerlekullanılamadığı durumlarda, YND verileri, validasyonla belirlenmiş değişken hassasiyeti göz önünde tutularak KSV analizi için de kullanılabilir. Bu analizlerin hassasiyet ve doğruluk oranı, dozu değişen fragmanın büyüklüğüne paralel olarak artar.

Günümüzde YND teknolojisi ile çoklu genlerin ya da tüm ekzomun tek testle incelenmesi mümkün olduğundan CGB'nın genetik incelemelerinde hedefli panel-gen ya da tüm ekzom yaklaşımları kullanılmaktadır. Hedefli panel-gen testleri ile yalnızca belli bir fenotip ile ilişkili bilinen genleri içerdiğinden analizlerde daha yüksek kapsama ve güvenliğe ulaşılmaktadır (%99'a kadar). Tüm ekzom ise daha fazla genin incelenmesine olanak sağlasa da okuma derinliği göreceli olarak panel testlere oranla daha düşük bulunmaktadır. Bu çalışmada non-sendromik CGB ilişkili bilinen 31 geniçeren panel test yaklaşımının irdelenmesi tercih edildi.

CGB tanısında YND tekniğinin kullanıldığı ilk çalışmalardan biri *Arboleda ve ark.* (2013) tarafından yapıldı ve 35 bilinen geni içeren panel çalışması ile 7 hastanın 2'sine (%28) tanı konuldu (213). Bilinen ve aday genleri içeren daha büyük panellerle çalışmalar da daha sonra yayınlandı. *Dong ve ark.'nın* (2016) 219 bilinen ve aday genleri içeren panel-gen testi çalışmasında 13 46,XY CGB olgusundan 9'u ve 8 46,XX CGB olgusundan 2'si özgün moleküler tanı almış ve tanı değeri sırasıyla %69.2 ve %25 olarak gerçekleşmiştir (214). *Eggers ve ark.'nın* (2016) 64 tanımlı ve 967 aday genden oluşan panel-gen testi ile 326 olgu (251'i tekil ve 75'i aile üyeleri ile birlikte) içeren çalışmasında tanı oranı %43 olarak bildirilmiştir (215). *Baxter ve ark.* (2015), TED yöntemi ile çalışılan 47 46,XY CGB olgusundaki verilerin biyoinformatik analizinin CGB ile ilişkili 64 gen için yapıldığında tanı oranının %35 olduğunu bildirmiştir (216). *Baetens ve ark.* (2016) da 9 46,XX CGB (ovo) testiküler olgusunu TED yöntemi ile incelemiş ve akraba olmayan 3 olguda *NR5A1* geninde c.274C>T (p.Arg92Trp) yanlış anlamlı mutasyon saptamışlar, böylece tanı oranı %33 olarak gerçekleşmiştir (217). *Özen S ve ark.* (2016) Türk populasyonunda yapılan ilk CGB ilişkili 56

gen içeren panel çalışmasında (TruSight^{TM}Exome, Illumina) 20 46,XY CGB olgusunda, 4 farklı gende 9 mutasyon saptanarak tanı oranının %45 olduğunu bildirmişlerdir (218).

Bu çalışmada CGB ilişkili 31 geni %98,29'luk kapsama oranı ile inceleme olanağı sağlayan *Ion Torent* platformu ile çalışılan panelimiz ile incelenen 44 indeks olguluk serimizde 17 olguda mutasyon saptanarak literatürle uyumlu %38.6 tanı oranına ulaşıldığı belirlenmiştir. Bu 44 olgunun 22'si daha önce *AR* ve *SRD5A2* genleri için SD ile incelenmiş ve herhangi bir mutasyon saptanmamıştı.

Gonad (testis) gelişiminde, androjen üretiminde ve işlevinde çok sayıda gen birlikte etkin olduğundan, ilişkili bu genlerdeki mutasyonlar 46, XY CGB'ye yol açmakta, klinik, laboratuar ve görüntüleme teknikleri her zaman genetik çalışmalar için yönlendirici olamamaktadır. 46, XY CGB olgularında *SRY* normal ve gonadlar testis ise ilişkili genler içinde en sıklıkla mutasyon *AR* ve *SRD5A2* genlerinde saptanmaktadır (219). *Akçay ve ark.* (2014), 101 46,XY CGB tanılı olgudan klinik ve laboratuar bulguları ile ADS ön tanısı alan 46'sı indeks ve 5'i kardeşlerden oluşan 51 olguluk serisinde ilk aşamada SD ile 7 indeks olguda (%15) *AR* geninde, mutasyon saptanmayan olgularda ise *SRD5A2* geni analizi ile 5 indeks olguda (%10,8) daha mutasyon saptandığını bildirmiştir (220). Bu nedenle genetik akış şemalarında ilk aşamada bu iki gen SD tekniği ile araştırılmaktadır. Laboratuarımızda da YND öncesinde SD tekniğiyle 133 XY CGB olgusu incelenmiş ve 17 olguda (%12,78) *AR*, 13 olguda (%9,7) *SRD5A2* geninde mutasyon saptanmıştı. Bu iki gende mutasyon saptanmayan 103 olgudan bu tez çalışması için onam veren 22 olgu YND ve MLPA teknikleri ile incelemeye alınmıştı. Bu tez kapsamında ilk olarak *AR* ve *SRD5A2* geni YND ile incelenen 19 46,XY CGB olgusunda bu genlerde herhangi bir mutasyon saptanmadı ve bu sonuç, olguların klinik ve laboratuar bulgularının çoğunlukla ADS uyumlu olmaması nedeniyle beklenen bir sonuç olduğu düşünüldü.

Özen ve ark.'nın (2016) *AR* ve *SRD5A2* gen mutasyonları dışlanmış 46,XY CGB olgu grubunda YND ile en sıklıkla mutasyon (6/20, %30) saptanan gen *HSD17B3* geni idi (218). Serimizde de 41 olgudan 7'sinde bu gende (%17) mutasyon saptanmış olması literatür bilgisini desteklemiştir.

Serimizde, bu geni ikişer olgu ile takip eden diğer genler *DHH, NR5A1, LHCGR* ve birer olgu ile *WT1, POR, ZFPM2 ve HOXA4* genleri idi. *Özen ve ark.'nın* (2016) serisinden farklı olarak serimizde *DHH, NR5A1, POR, ZFPM2 ve HOXA4* genlerinde mutasyon saptanması, *SRY* geninde ise mutasyon saptanmamasıdır.

***HSD17B3* geni;** 9q22'de lokalize *HSD17B3* geni tarafından kodlanan ve androstenedionu testosterona dönüşmesini kataliz eden 17β-HSD3 izozimi, sadece testiste

eksprese olmaktadır. *HSD17B3* geninde mutasyon saptanan olguların meta analizinin yapıldığı *Yang ve ark.'nın* (2017) çalışmasında değerlendirilen 158 olgunun çoğunluğun Batı Asya ve Avrupa kökenli olduğu, olguların fenotipinin 124'ünde kız (%78,5), 24'ünde dişiden erkeğe dönüşüm gösterdiği ve 8'inde ise erkek cinsiyetle uyumlu olduğu bildirilmiştir (221). Çocukluk çağında değerlendirilen olgularda başvuru nedeninin genellikle inguinal kanal ya da labiumlarda kitle, pubertal ya da erişkin dönemde ise virilizasyon olduğu, fenotipin normal dişi dış genital yapısından farklı derecelerde klitoromegaliye, mikropenis ve hipospadiasa kadar değişkenlik gösterdiğine dikkat çekilmiş, hCG uyarı testinde T/AD oranının 0,8'den az olmasının da her olguda gözlenmediği vurgulanarak tanı için genetik analizin önemi vurgulanmıştır (201,221). Mutasyon saptanan olgularımızda da klinik başvurunun değişken olması (şüpheli dış genital yapı, primer amenore, hipospadias), dış genital yapının bir olguda erkek diğerlerinde dişi cinsiyetle uyumlu olması, bir olguda T/AD oranının (>0.8) olması klinik spektrumun genişliğine örnek oluşturmakta ve genetik analizlerin gerekliliğini desteklemektedir.

Biallelik mutasyonları, 46,XY CGB ile ilişkilendirilmekte ve gende bugüne kadar büyük bir kısmı (41 adet) yanlış anlamlı/anlamsız nokta mutasyonlarından oluşmak üzere 59 farklı mutasyon bildirilmiştir (193).

HSD17B3 geninde saptanan c.277G>A (p.Glu93Lys) (Olgu 7) mutasyonu daha önce *Özen ve ark.'nın* (2016) çalışmasında bir olguda c.239G>A (p.Arg80Gln) mutasyonu ile birleşik heterozigot formda saptanmıştır (218). Bu mutasyon negatif yüklü glutamik asidin pozitif yüklü lizine dönüşmesine neden olmakta ve proteinin NAD(P) bağlayıcı domeininde yer almaktadır. Bu gende saptanan bir diğer c.277+4A>T mutasyonu (Olgu 8) daha önce *Boehmer ve ark.* (1999) tarafından bildirilmiş bir kırpılma hatası mutasyonudur (222). *Xiong ve ark'nın* (2015) kırpılma bölgesi değişimlerinin patolojik olup olmadığını değerlendirdikleri *in silico* analizlerde bu değişimin kırpılma paternini önemli derecede değiştirdiğini bildirmişlerdir (223). Bu mutasyonun intron 3'de donör kırpılma bölgesini etkilemesi beklendiğinden hastalık ilişkili olduğu düşünülmüş ve *Boehmer ve ark.'nın* (1999) çalışmasında *in vivo* transkriptte yol açtığı değişim cDNA düzeyinde gösterilmiştir. Aynı çalışmada yapılan genotip analizlerinde, aynı haplotipin paylaşıldığının gösterilmesi bu mutasyonun Hollanda, Almanya, Avusturalya ve Amerika populasyonu için kurucu (founder) olabileceği bildirilmiştir. Bu mutasyon, daha sonra *Phelan ve ark.'nın* (2015) ve *Hiort ve ark.'nın* (2017) Avrupa serilerinde de gösterilmiştir (224,225).

Serimizde olmayan ancak *Özen ve ark.'nın* serisinde birleşik heterozigot formda saptanan p.Arg80Gln mutasyonu, Araplarda 1:200-1:300 sıklıkla görülmesi, Hollanda,

Brezilya, Portekiz ve Kıbrıs populasyonlarında da saptanması nedeniyle bu mutasyonun Fenike kökenli olabileceği öne sürülmüştür (226). *Yang ve ark.*'nın (2017) meta analiz çalışmasında c.247+4A>T mutasyonunun Avrupa (allel frekansı 25/72) ve Amerikan (allel frekansı 9/24); p.Arg80Gln mutasyonunun Batı Asya (allel frekansı 21/54); p.Ala203Val mutasyonunun Latin (allel frekansı 10/34) ve p.Cys206* mutasyonunun (allel frekansı 8/18) ise Afrika populasyonu için kurucu (founder) olduğu bildirilmiştir (221).

Serimizde *HSD17B3* geninde saptanan mutasyonlardan bir diğeri de c.607-1G>A olup (Olgu 15), bu mutasyon ilk kez *Geissler ve ark.* (1994) tarafından bildirilmiştir (227). Genin 8. intronunda *acceptor* kırpılma bölgesinde gözlenen bu mutasyon anormal protein ürünün oluşumuna ve enzim aktivitesinin etkilenmesine neden olmaktadır.

Daha önce literatürde tanımlanmamış ve ilk kez bu çalışmada gösterilen (Olgu 9) c.639_640insA (p.Glu214fs*4) mutasyonu küçük insersiyon tipi mutasyon olup gen transkriptinde çerçeve kaymasına ve protein trunkasyonuna yol açması beklenmektedir. Çerçeve kayması, proteinin NAD(P) bağlama domeinini kodlayan bölgesini etkilemektedir.

Diğer bir tanımlanmamış c.182G>A (p.Gly61Gln) mutasyonu da *in silico* tahmin programlarında "zararlı" yönünde değerlendirildi. Bu yanlış anlamlı değişim non-polar nötr glisinin yerine negatif yüklü asidik glutamik asidin geçmesine neden olmaktadır. Henüz örnek vermeyen ve akraba evliliği bulunan ailede, olgunun etkilenmiş kardeşinde mutasyonun homozigot, anne babada heterozigot olarak gösterilmesi mümkün olursa saptanan bu varyantın patojenik olma öngörüsü güçlenecektir.

HSD17B3 geninde gösterilen homozigot c.167C>T (p.Ala56Val) mutasyonu da daha önce tanımlanmamıştı ve *in silico* tahmin programları "zararlı" olarak değerlendirmekteydi. Aynı pozisyondaki aminoasitin farklı bir değişimi, c.166G>A (p.Ala56Thr), önceki çalışmalarda bildirilmiştir (225,228). *Moghrabi ve ark.'nın* (1998) çalışmasında c.166G>A (p.Ala56Thr) mutasyonunun NADPH kofaktör afinitesini azaltarak enzimin katalitik aktivitesini değiştirdiği, ekspresyon ve immun blotlama analizleri ile gösterilmiştir (228). Saptadığımız mutasyonun polipeptit düzeyinde aynı pozisyondaki aminoasitin değişimine yol açması nedeniyle enzimin katalitik etkisini değiştirmesi beklenmektedir. Aile içi segregasyon analizleriyle bu değişimin sağlıklı kardeşlerinde homozigot olarak saptanmaması değişimin patojenik olma öngörüsünü destekleyecektir.

Olgu 14'de*HSD17B3* geninde birleşik heterozigot formda iki farklı varyant, tanımlı c.139A>G (p.Met47Val) ve tanımlanmamış c.704T>C (p.Met235Thr) saptandı ve olgunun c.139A>G (p.Met47Val) değişimini anneden, c.704T>C (p.Met235Thr) değişimini babadan kalıttığı gösterildi. c.139A>G (p.Met47Val) değişiminin CGB ilişkisi, daha önce *Eggers ve*

ark.'ları (2016) tarafından bir olgu da birleşik heterozigot, diğer olgu da ise homozigot formda bildirilmiştir (215). Bu çalışmada, birleşik heterozigot olarak gösterilen olguda (c.139A>G ve c.645A>T) androjen sentez kusuru benzeri fenotipin, homozigot olarak yalnızca c.139A>G değişimini taşıyan olguda ise izole hipospadias görüldüğü bildirilmiştir. Çalışmamızdaki olguda saptanan daha önce tanımlanmamış diğer değişim c.704T>C (p.Met235Thr) *in silico* tahmin programlarında "zararlı" lehine değerlendirmekteydi. Protein düzeyinde aynı pozisyondaki amino asit (p.Met235Val) değişimine yol açan c.703A>G daha önce *Geissler ve ark.* (1994) tarafından hastalıkla ilişkilendirilmiştir (227). Bu iki olgu ve olgumuz birlikte değerlendirildiğinde, c.139A>G mutasyonunun başka bir mutasyonla bileşik heterozigot olarak bulunmasının homozigotluğuna oranla daha ağır fenotipe yol açabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu hipotezin doğrulanması için daha fazla homozigot ve bileşik heterozigot olgunun değerlendirilmesi önemli olacaktır.

***DHH* geni;** OR kalıtım gösteren Hedgehog gen ailesinin üyesi olan, morfogenezin düzenlenmesinde önemli rolü olan *DHH* geninde bugüne kadar 8 yanlış anlamlı/anlamsız, 2 küçük delesyon, 1 küçük insersiyon ve 1 büyük insersiyon mutasyonu kısmi veya tam gonadal disgenezinin görüldüğü, polinöropati eşlik ettiği/etmediği 46,XY CGB olgularında tanımlanmıştır (58,193,201). Çalışmamızda *DHH* geninde bir olguda (Olgu 1) c.1146G>A (p.Trp382*) homozigot, bir diğerinde (Olgu 3) ise 2 farklı homozigot varyant c.71G>C (p.Gly24Ala) ve c.1063 C>T (p.Arg355Cys) saptandı. Bu 3 değişim de daha önce tanımlanmamıştı.

Olgu 1'de saptanan c.1146G>A (p.Trp382*) değişimi anlamsız tipte bir mutasyon olup protein trunkasyonu nedeniyle fenotipi etkilemesi beklenir. Bu mutasyon, proteinin aktivitesinde önemli rolü olan, evrimsel olarak korunmuş Hint domeininde yer almaktadır. Literatürde 3' kodlayan bölge noktasına en az 50-55 bç'i 5' yönünde ve gerisinde bulunan erken terminasyon kodonlarının NMD (*nonsense mediated decay*) mekanizması ile yıkıldığı bildirilse de, bu durumdan sapmalar olduğu bazı örnek transkriptlerde (örneğin T hücre reseptörü beta-transkripti) gösterilmiştir (229). *DHH* geninde anlamsız mutasyon 3' kodlayan bölgeye 42 bç'i 5' bölge yönünde oluşan bu değişim erken terminasyon kodonu nedeniyle protein translasyonunun erken sonlanmasına ve takibinde trunke protein oluşumuna neden olması beklenir ancak 50 bç teorisine göre NMD mekanizması ile yıkılması gerçekleşmeyedebilir. *In silico* tahmin programlarında "zararlı" olarak değerlendirilen bu değişimin olgunun etkilenmiş kardeşinde de gösterilmesi değişimin ailevi ve fenotip ilişkili olduğunu göstermektedir.

Tam cinsiyet dönüşümü gösteren Olgu 3'de homozigot olarak saptanan her iki değişim de c.71G>C (p.Gly24Ala) ve c.1063C>T (p.Arg355Cys) yanlış anlamlı değişimlerdir. p.Arg355Cys değişimi, Provean/Sift tahmin programında "tolere edilebilir" olarak değerlendirilse de, diğer tahmin programları her iki değişim de "zararlı" olarak değerlendirilmektedir. Akraba evliliği ürünü olan olgunun hipospadias ve kriptorşidizmli erkek kardeşinin bu değişimler için incelenmesi önerildi. Aile içi segregasyon analizi varyantların fenotipik spektrumunun aydınlatılmasına katkı sağlayabilir. İki varyantın aynı gende birbirinden uzak mesafelerde bulunması ve eğer bir rekombinasyon olayı da gösterilir ise, varyantların zigozitesi ile fenotip karşılaştırması yapılabilir, fenotip ilişkili mi yoksa tesadüfi bir polimorfizm mi olduğu yönünde yorum yapılabilir.

***NR5A1*geni;** OD kalıtım gösteren gen, 9q33.3'de yerleşimli, cinsiyet ve adrenal farklılaşma için önemli bir transkripsiyon faktörü olan SF1 proteinini kodlar ve bu protein hipotalamik-hipofizer-gonadal aksın, adrenal ve gonadal steroidogenezin düzenlenmesinde anahtar görev alır (58,201). *NR5A1* geninin heterozigot mutasyonları 46,XY CGB ve adrenal yetmezlik ile ilişkilendirilmiştir. *NR5A1* mutasyonlarının spektrumu, tam gonadal disgeneziden izole glandüler hipospadiasa veya tam normal erkek fenotipine kadar geniştir (201). Bugüne kadar bu gende büyük bir kısmı yanlış anlamlı/anlamsız olmak üzere (105 adet) toplam 166 mutasyon gonadal disgenezi, ovaryen yetmezlik, kriptorşidi, hipospadias, anorşi, primer amenore vb fenotiplerle ilişkilendirilmiştir (193).

Serimizde bu gende iki olguda iki yeni varyant saptanmıştır. Olgu 5'de saptanan c.247G>T (p.Val83Leu) varyantı proteinin DNA bağlama domeininde yer almakta olup evrimsel olarak korunmuş bir amnino asiti (Valin) değiştirmektedir ve *in silico* tahmin programları "zararlı" değişim olarak değerlendirmektedir. *Köhler ve ark'ı* (2008) testiküler disgenezi ve adrenal yetmezliği olmayan, epididim ve vas-deferensin görüldüğü 17 yaşındaki fizik muayenesinde kliteromegali ve bilateral inguinalde palpe edilen gonadları olan dişi bireyde *de novo* c.251G>A (p.Arg84His) heterozigot mutasyonu bildirmişlerdir (230). Bu mutasyonun DNA-bağlama domeininin C-terminalinde çinko-parmak bağlayıcı ve A-kutusu arasında bulunduğu ve hücresel lokalizasyondaki değişim nedeniyle reseptör etkileşimini bozduğu ve transkripsiyonel aktivasyonu etkilediği gösterilmiştir. Olgumuzdaki c.247G>T (p.Val83Leu) mutasyonun da aynı bölgeyi etkilemesi nedeniyle *in vivo* olarak benzer sonuca yol açması beklenmektedir. Olgumuzun klinik bulgularının daha hafif oluşu (hipospadias) genin fenotipik çeşitliliğine örnek oluşturmaktadır. Aile içi segregasyon analizi ile olgunun hipospadiaslı babasının bu değişimi taşıdığı ve annenin taşımadığının gösterilmesi bulguları mutasyon lehine güçlendirmektedir.

Bu gende saptadığımız diğer bir tanımlanmamış mutasyon c.151G>T (p.Glu51*) *in silico* tahmin programları "zararlı" olarak değerlendirmekteydi. dbSNP'de rs775441984 referans numarası ile kayıtlı olan bu değişim kaynak çalışma bildirilmemiş olmasına rağmen anlamsız değişim olması nedeniyle patojenik olarak gösterilmiştir. Bu mutasyonun, proteinin türler arasında korunmuş DNA-bağlama domeininde 2. çinko-parmak bağlama bölgesinde olması nedeniyle proteinde işlev kaybına yol açacağı öngörülmektedir. *Köhler ve ark.'ı* (2008), daha önce proteinin 1. çinko-parmak bağlama alanındaki başka bir mutasyonun, c.98G>C (p.Cys33Ser) SF1-DNA bağlanmasını bozduğunu ve dominant-negatif etki olmaksızın transkripsiyonel aktivasyonun tamamen kaybına yol açtığını bildirmişlerdir (230). Olgumuzda saptanan c.151G>T (p.Glu51*) mutasyonu erken dur kodonu oluşturmakta ve protein trunkasyonuna yol açmakta, trunke proteinler de NMD mekanizması ile yıkıldığından fonksiyon kaybı oluşmaktadır. Bu nedenle, yukarıdaki çalışmada bildirilen yanlış anlamlı mutasyona oranla olgumuzdaki mutasyonun çok daha ağır bir etki göstermesi öngörülmektedir. Fenotipik spektrumu çok geniş olan *NR5A1* mutasyonlarında, serimizde bu gende mutasyon saptanan iki olgudan birinde olan gonadal disgenezinin olguların yaklaşık %10-15'de görüldüğü bildirilmiştir (231,232). *Lin ve ark.'nın* (2008) ve *Allali ve ark.'nın* (2011) serilerindeki *NR5A1*mutasyonu taşıyan 46, XY CGB olgularının yaklaşık %15'inde adrenal anomali saptanmamıştır (233,234). Çalışmamızdaki iki olgunun hormonal bulgularında da adrenal yetmezlik ile uyumlu bulgu görülmemiştir.

Bu gende tanımlanan heterozigot mutasyonlar çoğunlukla *de novo* olsa da, üçte biri anneden cinsiyet sınırlı dominant olarak kalıtılmaktadır (232). Mutasyonu heterozigot olarak taşıyan kadınlarda klinik bulgu olarak prematür over yetmezliği görülmektedir. Olgularımızın birinde mutasyonun babadan kalıtıldığı gösterildi ancak diğer olgunun aile çalışması henüz tamamlanmadığından kalıtımı belirlenemedi.

***LHCGR* geni;** 2p21'de lokalize LH reseptör geni, erkek ve dişi cinsiyet farklılaşmasında, puberte gelişiminde ve üremede önemli rolü vardır. Bu genin homozigot ve birleşik heterozigot fonksiyon kaybı mutasyonları 46,XY bireyde hormon uyarısına direnç ve Leydig hücre hipoplazisi ile ilişkilendirilmektedir (58). Serimizde bu gende biri daha önce tanımlanmış c.1435G>T (p.Arg479*), diğeri tanımlanmamış c.203C>T (p.Ala68Val) iki farklı varyant saptandı. c.1435G>T (p.Arg479*) mutasyonu daha önce *Ben Hadj Hmida ve ark.'nın* (2016) ekzom dizileme çalışmasında normal dişi dış genital yapısı olan, sekonder seks karakterleri gelişmeyen, MRI incelemesinde bilateral gonadlar, uterus ve üst vajenin görülmediği primer amenoreli 3 Tunuslu 46, XY dişi olgusunda bildirilmiştir (235). ExAC veritabanında bu değişim, Fin popülasyonun da heterozigot formda bir bireyde bildirilmiş

olup, allel frekansı 1/6612 (MAF 0.0001512)'dir. Bu mutasyon trunke protein oluşumuna yol açmakta ve mRNA transkriptinin NMD mekanizması ile yıkıma uğrayacağı tahmin edildiğinden reseptörün işlev kaybetmesi beklenmektedir. Dişi fenotip ile ilişkili *LHCGR* mutasyonları nadirdir ve bugüne kadar dişi veya dişi olarak yetiştirilmiş şüpheli genitalyalı olgularda 8 homozigot veya birleşik heterozigot mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu olguların çoğunlukla klinik başvuru nedeni primer amenoredir. Çalışmamızda mutasyon saptanan olgunun da klinik başvuru nedeni primer amenore idi. Akraba evlilik oranlarının yüksek olduğu ve endogaminin gözlendiği Arap ve Türk toplumlarında bu gendeki fonksiyon kaybettirici mutasyonların frekansının yüksek olduğu düşünülmektedir (235).

Bu gende saptanan daha önce literatürde bildirilmemiş olan c.203C>T (p.Ala68Val) mutasyonu *in silico* tahmin programlarında (MutationTaster ve PolyPhen-Hum Var) "zararlı" olarak değerlendirilmektedir. Evrimsel olarak da korunmuş bir bölge olan proteinin transmembran domeinini etkileyen bu yanlış anlamlı değişimin fenotipik bulgulara yol açması beklenmektedir. Parsiyel reseptör kusurlarında hipospadiasın veya mikropenisin eşlik ettiği normal erkek cinsiyet farklılaşmasının gözlemlendiği bildirilmektedir (236,237). Genellikle yanlış anlamlı mutasyonların anormal protein ürünlerinin kısmen işlev görmesi nedeniyle, anlamsız,çerçeve kayması veya kırpılma hatasına yol açan mutasyonlarına oranla proteinin fonksiyonunu tamamen yok olmadığı bilinmektedir. Olgumuzun da klinik ve hormonal bulgularının parsiyel LH reseptör kusuru ile uyumlu olması bu beklentiyi desteklemekteydi.

***WT1* geni;** 11p13'de lokalize, çinko-parmak transkripsiyon faktörü kodlayan, Wilms tümör baskılayıcı (*WT1)* geni, böbrek ve gonadların gelişimi ve işlevinin düzenlenmesinde önemli rol üstlenmektedir (58). Genin 1. – 6. ekzonları, prolin-glutamince zengin transkripsiyon düzenleyici bölgeyi ve 7. – 10. ekzonları ise DNA bağlanma domeininin dört adet çinko parmak birimlerini kodlamaktadır (238).

Olgumuzda saptanan c.1385G>T (p.Arg462Leu) mutasyonu daha önce 18 yaşında, unilateral Wilms tümörü ve Denys-Drash benzeri fenotipi taşıyan dişi bir olguda tanımlanmıştı (239). Genin evrimsel olarak korunmuş bölgesindeki bu mutasyon, proteinin "çinko parmak C2H2*"* domeininde pozitif yüklü aminoasitin yüksüz aminoasite dönüşümüne neden olmaktadır. *Barrera ve ark.'ları* (2016) fonksiyonel karakterizasyon çalışmaları ile bu değişimin DNA bağlama afinitesini azalttığını göstermişlerdir (240). Tam gonadal disgenezi tanılı iki yaşındaki olgumuzda Wilms tümörü gözlenmedi. Aynı pozisyondaki G>C dönüşümü (c.1385G>C, p.Arg462Pro) ise tam cinsiyet dönüşümü gösteren Denys-Drash sendromu ile ilişkilendirilmişti (241). Non-sendromik olgularda kesin klinik tanının hormon değerleri ve histopatolojik incelemelerle konulması çok zordur (201). Olgumuzda da

sendromik bulgular, proteinüri/nefropati olmadığı için ayırıcı tanıda gonadal disgenezi düşünülmüş ve kesin tanı genetik analiz sonucu ile konulabilmiştir.

***POR* geni;** P450oksidoreduktaz (POR) bir flavoproteindir ve CYP17A1, CYP21A2 ve CYP19A1 gibi önemli steroidogenez enzimleri için zorunlu elektron donörüdür. POR eksikliği olan olgularda genellikle mineralokortikoid sentezi normal iken, kortizol ve cinsiyet steroid sentezi, mutasyonun tipine bağlı olarak çeşitli düzeylerde etkilenmektedir. *POR* mutasyonları hem 46, XY CGB hem de 46, XX CGB ile ilişkilendirilmiştir. Bu genin daha ağır mutasyonları iskelet malformasyonlarının görüldüğü Antley-Bixler Kraniyosinostoz sendromu olarak tanımlanmıştır (242). *Flück ve ark.'ları* (2011) akrabalık ilişkisi olmayan iki Türk olguda 9 bç'lik bir delesyon (c.1196_1204delCCTCGGAGC, p.Pro399_Glu401del) tanımlamıştır. Her ikisi de akraba evliliği ürünü olan 46, XX CGB'li olguların fenotipleri farklıydı; olgulardan birinde hafif ABS fenotipi, *in utero* virilizasyon ve 17'OH progesteronun hafif yüksekliği, diğer olguda ise ağır ABS fenotipi, subklinik kortizol eksikliği vardı. Bu iki olguda da *in vitro* fonksiyon testleri ile sitokrom p450 enzimlerinin aktivitesinde azalma (%68-85) gösterilmiştir (242).

Serimizde bir olguda saptadığımız tanımlanmamış *in frame* c.1196_1204dupCCTCGGAGC (p.Pro399_Gln401dup) mutasyonu aynı bölgede yer almaktadır. Proteinde çerçeve kaymasına neden olmayan bu mutasyon, FAD-bağlama domeinini etkilemektedir. 1.5º kuzen evliliği olan ailede yapılan segregasyon analizinde mutasyonun anne ve babada heterozigot saptanması, sağlıklı 4 kardeşinden 3'ünde heterozigot, birinde ise homozigot normal görülmesi bu değişimin hastalık ilişkili olma olasılığını desteklemiştir. Olgumuzun fenotipi (hafif ABS fenotipi, parsiyel adrenal yetmezlik) *Flück ve ark.*'larının bir olgusu ile örtüşmektedir. *Flück ve ark.* (2011), *in silico* analizlerle mutasyonun FMN domeininde kararsız yapı oluşmasına yol açacağını ve interaksiyonun bozulması sonucunda NADPH-FAD elektron transferinin etkileneceğini öngörmüşlerdir (242). Mutasyonumuzla ilgili *in vitro* tasarladığımız üç boyutlu modelleme çalışmasında, FMN domeininde alfa-heliksin (*p*P399-*p*M408) uzadığı ve kararlılık için önemli olduğu düşünülen *p*C437, *p*P438 ve *p*S439 aminoasitleri ile olan mesafenin değiştiği ve daha kararsız yapının oluştuğu görülmüştür (Şekil 4-5 ve 4-6).

***ZFPM2* geni;** 8q23.1'de lokalize, OD etki gösteren *ZFPM2* geni mutasyonları konjenital kalp hastalıkları (Fallot tetralojisi), diyafragmatik herni ile ilişkilendirilmekte ancak izole 46,XY tam veya kısmi gonadal disgenezili olgularda da heterozigot ya da homozigot yanlış anlamlı değişimler bildirilmiştir (243). Memelilerde GATA transkripsiyon faktörü, hematopoez ve kardiyogenezde önemli düzenleyicidir ve diğer transkripsiyon faktörleri,

koaktivatör ve represörlerle etkileşim içerisindedir. Bu modülatörlerden biri de *friend of GATA4* (*FOG2*)/çinko parmak proteini (*ZFPM2*)'dir. Fonksiyonel çalışmalar, mutant ZFPM2 proteinlerinin erken testiküler farklılaşma regülatörü olan GATA4 ile etkileşimindeki sorunların 46,XY CGB olgularında testis gelişimini bozduğunu göstermektedir (193). Farklı serilerde konjenital diyafragma hernisi (244), AVSD (245) ile ilişkilendirilen c.292G>A (p.Asp98Asn) değişimi, *Eggers ve ark.* (2016) tarafından 278 olguluk büyük bir CGB kohortunda da bildirilmiş ve bu gende toplam 9 yanlış anlamlı ve bir çerçeve kayması mutasyonu tanımlanmıştır (215). Literatürde tanımlanan diğer bir nadir yanlış anlamlı varyant (p.Ser420Arg) sağlıklı taşıyıcı annenin çocuğunda (46,XY) şüpheli genital yapı (penoskrotal hipospadias) ile ilişkilendirilmiştir (243). Serimizde bir olguda *ZFPM2* geninde saptanan c.286G>T (p.Asp98Tyr) değişimi daha önce tanımlanmamıştır ve *in silico* analizleri farklı tahminler vermektedir (Mutation taster ve SIFT "zararlı", Provean ve Polyphen – Hum Var "zararsız - tolere edilebilir"). Aile içi segregasyon analizinde olgunun annesinin bu değişimi taşıdığı, babasının ise taşımadığı belirlenmiş, değişimin etkisinin cinsiyet ile sınırlı olması nedeniyle hastalık ilişkili olduğu yönünde değerlendirilmiştir. ExAC veritabanında 45 434 bireyden 3'ünde heterozigot, GME veritabanında (Orta Doğudan çeşitli Mendel ve infeksiyöz hastalıkları olan 2497 bireyin tüm ekzom dizi analizi verileri) 985 allelde 7 heterozigot olarak bildirilmiştir. Segregasyon çalışmasının genişletilerek annenin sağlıklı erkek kardeşlerinde bu değişimin incelenmesi, varyantın hastalık ilişkili bir değişim olup olmadığının yorumlamasına katkı sağlayacaktır.

***HOXA4* geni;** 7p15-p14'de lokalize, *HOXA4* homeobox gen ailesinin üyesidir ve bu gendeki mutasyonlar izole hipospadiaslı olgularda tanımlanmıştır. Genital kabartının gelişimi ile ilişkili bugüne kadar tanımlanmış genlerden *BMP4, BMP7, HOXA4, HOXB6, FGF8* ve *FGFR2* hipospadias ile ilişkili olarak bildirilmiştir (246). Çalışmamızda *HOXA4* geninde ekzon 1'de heterozigot c.9G>T (p.Met3Ile; rs141143994) değişimi daha önce fenotiple ilişkilendirilmemiştir. ExAC veritabanında 38 627 bireyden 14'ünde heterozigot olarak bulunmuş bu değişim için *in silico* analizler patojenik tahmini vermektedir. Aile içi segregasyon analizinde aynı varyantı annenin heterozigot olarak taşıdığı, babanın ise taşımadığı belirlenmiştir. Annenin sağlıklı kardeşlerinde bu değişimin varlığının araştırılması, varyantın hastalık ilişkili bir değişim olup olmadığının yorumlamasına katkı sağlayacaktır.

Serimizdeki iki 46,XX CGB olgusundan birinde biallelik mutasyonları CGB ile ilişkilendirilen *POR* geninde c.461A>T (p.Asp154Val) değişimi heterozigot olarak saptanmıştı. Bu varyantın *in silico* analizlerinde PolyPhen-HumVar "zararsız" olarak değerlendirirken diğer programlar "zararlı" olarak değerlendirmektedir. Tüm gen dizi analizi

tamamlanarak diğer allelde dizi analizi ile saptanabilecek mutasyonlar dışlanmış olmasına karşın bu test ile gösterilemeyecek del/dup mutasyonların olası varlığı göz ardı edilemez. Nitekim bu gende bugüne kadar 6 farklı büyük delesyon gösterildiğinden ve kullandığımız MLPA kitinde *POR geni* bulunmadığından bu olasılık dışlanamamıştır.

Literatürde Klinefelter sendromlu (47,XXY) 3 olguda *AR* geninde 4 mutasyon tanımlanmış, bu olguların birinde parsiyel diğer ikisinde tam ADS görülmüştür. Bir olgumuz da 47,XXY karyotipi olmasına rağmen dış genital yapının şüpheli olması nedeniyle seriye alınmış ancak incelenen genlerde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Bu olguda kromozomal açıdan yalnızca periferik kan örneğinin değerlendirilmiş olması nedeniyle diğer dokulardaki 45,X mozaisizm olasılığı dolayısıyla "mikst gonadal disgenezi" de ayırıcı tanıda henüz dışlanamamıştır. *Akcan* ve *ark.* (2017) çalışmasında şüpheli genital yapı saptanan diğer 3 Klinefelter sendromlu olguda *AR* ve *SRD5A2* genleri dizilenmiş ve birinde *AR* (p.P892L) diğerinde *SRD5A2* (p.G196S) genlerinde hastalık ilişkili varyant saptanmış ve şüpheli genitalya saptanan Klinefelter olgularında bu genlerin araştırılması önerilmiştir (247).

Özetle, çalışmamızda yer alan 44 etkilenmiş olgu tasarladığımız hedefli panel-gen testi ile *Ion Torrent* PGM'de, CGB ile ilişkili 31 genin kodlayan ekzon bölgeleri ile ekzonların 10 bç intron sınır bölgelerini içeren 86,94 kb'lik alanda toplam 315 amplikon ile % 98,29 kapsam (coverage)'da dizileme yapıldığındatoplam 17 olguda 8 farklı gende (*HSD17B3, DHH, NR5A1, LHCGR, WT1, POR, ZFPM2* v*e HOXA4*) 6'sı daha öncetanımlanmış ve 13'ü literatürde bildirilmemiş olası ilişkili varyantlar saptanarak tanı oranının % 38,6 olduğu belirlenmiştir. Panel gen testinin kapsam dışında kalan hedef gen bölgelerinde yapılan Sanger dizi analizleri bu bölgelerde herhangi bir mutasyon gösterilememiştir.Literatürde CGB olgularında TED ile çalışılsa dahi biyoinformatik analizin ilişkili genler için yapılması ile (klinik ekzom) tanı oranının yaklaşık %35-40 olduğu bildirilmektedir. Bu veriler karşılaştırıldığında hedeflenmiş panel-gen testinin tanıda hedef genler için daha geniş kapsam ve derinlikte dizileme yapması ile bir çok varyantın doğrulama gereksiniminden tasarruf sağlarken, TED yaklaşımı yeni genlerin de analizine olanak sağlama potansiyeli olduğundan avantajlı görünmektedir. Bu çalışma ve literatüre dayanarak CGB'li olguların genetik analiz akışında iş gücü, test süresi bakımından karşılaştırıldığında olguların panel-gen testi ile çalışılmasının doğru bir strateji olduğunu desteklemektedir.Genlerin anlatımını etkileyebilen derin intronik bölgelerde düzenleyici bölge varyantları (enhancer, promoter, introndaki düzenleyici bölgeler) da hastalıkla ilişkili olabilmektedir. Birçok tek gen hastalığı için ilişkili genlerde görüldüğü gibi CGB ilişkili genlerde de kodlama yapmayan düzenleyici ve intronik bölgelerdeki değişimler literatürde bildirilmiştir. *Assumpçao ve ark.'ı* (2005) 46,XY tam

gonadal disgenezili indeks olgu ve babasında *SRY* geninin promotöründe Sp1 transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesini kısmi olarak içeren 3 bç'lik delesyon bildirmişler (248). *Sutton ve ark.* (2011), üç 46,XX testiküler CGB olgusunda *SOX3* geninin regülatör bölgelerinde fonksiyon kazanım mutasyonları olan yeniden düzenlenmeler tanımlamış ve *SRY* yokluğunda *SOX3* ekspresyonunun erkek yönündeki farklılaşmayı tetiklediği ve cinsiyet dönüşümüne neden olduğunu ileri sürmüştür (211). *Calvari ve ark'ı* (2000) tarafından gonadal disgenezili bir olguda 9p delesyonu, *DMRT1* geninin 5'-uç bölgesinde 6.5 kb düzenleyici bölgeyi ve birçok regülatör diziyi içine aldığı bildirilmiştir (249). *Smyk ve ark.'ı* (2007) *DAX1*'in 3'-uç bölgesinde maternal kalıtılan 250 kb'lik bir delesyonu 46,XY CGB'li olguda bildirmişlerdir (250). *Kansakoski ve ark.'ı* (2016) *AR* geninde derin intronik varyantın (c.2450-118A>G) tam ADS'li iki kardeşte TGD ile tanımlamış ve varyantın *de novo* 5'-kırpılma noktası oluşturarak iki anormal transkipt ürününün oluşmasına yol açtığını bildirmişlerdir (251). Bu bilgiler ışığında olgu grubumuzda mutasyon saptanmayan olgularda bir sonraki aşamada tüm genomda kopya sayı değişikliklerinin analizi amacıyla array CGH tekniği/mikroarray ile analiz ve daha sonraki aşamada derin intronik bölgelerin araştırılmasının uygun olacağını düşünmekteyiz.

CGB olgularının analizinde genomik diziler ve regülatör bölgelerdeki değişimler kadar epigenetik düzenlenmeler de önemlidir. Fare çalışmaları ile *SRY* geninin 5'-uç bölgesinin fertilizasyonu takip eden farklı günlerde metilasyon profiline bağlı olarak gen anlatım paterninin değiştiğini bildirmişlerdir (252,253). *Gimelli ve ark.* (2006), 46,XY tam cinsiyet dönüşümü gösteren bir olguda saptanan Y inversiyonunun, ökromatin bölgede yerleşik *SRY*'nin hemen komşuluğunda heterokromatin bölgede (Yq12) gerçekleştiğinde, pozisyonal çeşitlilik etkisi (PEV) olarak isimlendirilen bir oluşum ile *SRY* geninin baskılanmasına neden olabildiğini ileri sürülmüştür. Heterokromatin bölgelere komşu olan ökromatin bölgelerde düzenleyici faktörlerin ulaşımına mani olabilecek biçimde yapısal değişikliklerin anormal bölümlenmelere yol açabildiği ve hatta, *SRY* yakınında heterokromatin bölge oluştuğunda, DNA metillenmesi gibi epigenetik etkilerin sonucunda *SRY* anlatımının durduğu bildirilmektedir (252). Bu olguda da babaya kıyasla indekste *SRY*'nin 3kb uç bölgesinin iki kat daha fazla metile olduğu ve DNA metilasyonu epigenetik mekananizmasının *SRY* anlatımını negatif yönde etkilediği ve gonadal gelişimde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu örnekten yola çıkarak çeşitli epigenetik mekanizmaların gonadal gelişimde etkin olduğu düşünülebilir. Ancak, CGB olgularında epigenetik değişimlerin etkilenmiş dokuda gösterilmesi günümüzde zor olsa da, pluripotent kök hücre teknolojisinin gelişmesi ile

genomik varyantların gonadal farklılaşmaya etkileri temsilci hücre hatlarında analiz edilebilir hale gelecektir.

Akraba evliliği oranının yüksek olduğu populasyonumuzda mutasyon frekanslarının saptanması, taşıyıcı bireylerin erken dönemde belirlenmesi aile planlaması için yönlendirici olacağını düşünmekteyiz. Gonadal gelişim kusuru olan veya kromozomal cinsiyetle uyumsuz yetiştirilen bireylerin erken dönemde tanı almaları gonadal tümörler açısından erken dönemde tanı ve takip şansı doğuracaktır.

KAYNAKLAR

1. Blackless M, Charuvastra A, Derryck A, Fausto-Sterling A, Lauzanne K, Lee E. How sexually dimorphic are we? Review and synthesis. American Journal of Human Biology 2000; 12(2): 151-166.
2. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. Consensus statement on management of intersex disorders. Pediatrics 2006; 118(2): e488-e500.
3. Sax L. How common is lntersex? A response to Anne Fausto-Sterling. Journal of sex research 2002; 39(3): 174-178.
4. Hughes IA. Disorders of sex development: a new definition and classification. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2008; 22(1): 119-134.
5. Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA, Society LWPE. Consensus statement on management of intersex disorders. Journal of pediatric urology 2006; 2(3): 148-162.
6. Rey RA, Grinspon RP. Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2011; 25(2): 221-238.
7. Ono M, Harley VR. Disorders of sex development: new genes, new concepts. Nature Reviews Endocrinology 2013; 9(2): 79-91.
8. Carillo A, Damian, M., Berkovitz, G. Disorders of sexual diff erentiation. In: Pediatric Endocrinology 2007, Vol. 2, 5th, edn. Informa Healthcare USA Inc NY, 365-390.
9. Carlson BM. Human Embryology and Developmental Biology: with STUDENT CONSULT Online Access. Elsevier Health Sciences; 2012.
10. Larson A, Nokoff NJ, Travers S. Disorders of sex development: clinically relevant genes involved in gonadal differentiation. Discovery medicine 2012; 14(78): 301-309.
11. Keith L, Moore T. The developing human: clinically oriented embryology. 7th Elsever Science (USA) 2008: 158-185.
12. Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, ve ark. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. Genes & development 1999; 13(4): 424-436.
13. Saitou M, Payer B, O'Carroll D, Ohinata Y, Surani MA. Blimp1 and the emergence of the germ line during development in the mouse. Cell Cycle 2005; 4(12): 1736-1740.
14. Schoenwolf G, Bleyl S, Brauer P, Francis-West P, Schoenwolf G, Bleyl S, ve ark. Development of the pharyngeal apparatus and face. Larsen's human embryolog, 4th edn. Churchill Livingston Elsevier, Philadelphia 2009.

15. Ying Y, Qi X, Zhao G-Q. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences 2001; 98(14): 7858-7862.

16. Sadler TW. Langman's medical embryology. Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

17. Molyneaux K, Wylie C. Primordial germ cell migration. International Journal of Developmental Biology 2004; 48(5-6): 537-543.

18. Raz E. Guidance of primordial germ cell migration. Current opinion in cell biology 2004; 16(2): 169-173.

19. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. Endocrine reviews 2009; 30(6): 624-712.

20. Biason-Lauber A. Control of sex development. 2010. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab; 24: 163-186.

21. Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW, Viger RS. A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. BMC molecular biology 2008; 9(1): 44.

22. Piferrer F. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. Developmental Dynamics 2013; 242(4): 360-370.

23. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. Nature 2003; 423(6942): 825.

24. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature 1990; 346(6281): 240.

25. Biason-Lauber A. Control of sex development. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2010; 24(2): 163-186.

26. Biason-Lauber A, Konrad D. WNT4 and sex development. Sexual Development 2008; 2(4-5): 210-218.

27. Satoh M. Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. Journal of anatomy 1991; 177: 85.

28. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Larsen's Human Embryology E-Book. Elsevier Health Sciences; 2014.

29. Allard S, Adin P, Gouédard L, di Clemente N, Josso N, Orgebin-Crist M-C, ve ark. Molecular mechanisms of hormone-mediated Mullerian duct regression: involvement of beta-catenin. Development 2000; 127(15): 3349-3360.

30. Paranko J, Foidart J-M, Pelliniemi LJ. Developmental changes in interstitial collagens of fetal rat genital ducts. Developmental biology 1986; 113(2): 364-372.

31. Roberts LM, Visser JA, Ingraham HA. Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development. Development 2002; 129(6): 1487-1496.

32. Josso N, Rey R, Picard J-Y. Testicular anti-Müllerian hormone: clinical applications in DSD. Paper presented at: Seminars in reproductive medicine2012.

33. Moore Keith L, Persaud T. The Developing Human, Clinically Oreinted Embryology. Chapter 1993; 17: 410.

34. Klonisch T, Fowler PA, Hombach-Klonisch S. Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. Developmental biology 2004; 270(1): 1-18.

35. Heikkilä M, Prunskaite R, Naillat F, Itäranta P, Vuoristo J, Leppäluoto J, ve ark. The partial female to male sex reversal in Wnt-4-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. Endocrinology 2005; 146(9): 4016-4023.

36. Soyal SM, Amleh A, Dean J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. DEVELOPMENT-CAMBRIDGE- 2000; 127(21): 4645-4654.

37. Liu C-F, Liu C, Yao HH-C. Chapter Seven-Building Pathways for Ovary Organogenesis in the Mouse Embryo. Current topics in developmental biology 2010; 90: 263-290.

38. Carlson BM. Human Embryology and Developmental Biology E-Book: with STUDENT CONSULT Online Access. Elsevier Health Sciences; 2012.

39. Pryse-davies J, Dewhurst C. THE DEVELOPMENT OF THE OVARY AND UTERUS IN THE FOETUS, NEWBORN AND INFANT: A MORPHOLOGICAL AND ENZYME HISTOCHEMICAL STUDY. Obstetrical & Gynecological Survey 1972; 27(3): 200.

40. Baker T. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 1963; 158(972): 417-433.

41. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson Genetics in Medicine E-Book. Elsevier Health Sciences; 2015.

42. Nielsen J, Wohlert M. Chromosome abnormalities found among 34910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Århus, Denmark. Human genetics 1991; 87(1): 81-83.

43. Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, ve ark. Cytogenetics of infertile men. Human reproduction 1996; 11(suppl_4): 1-26.

44. Klinefelter Jr HF, Reifenstein Jr EC, ALBRIGHT JR F. Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without A-Leydigism, and increased excretion of follicle-

stimulating hormone. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 1942; 2(11): 615-627.

45. Messina MF, Sgrò DL, Aversa T, Pecoraro M, Valenzise M, De Luca F. A characteristic cognitive and behavioral pattern as a clue to suspect Klinefelter syndrome in prepubertal age. The Journal of the American Board of Family Medicine 2012; 25(5): 745-749.

46. de la Chapelle A. Analytic review: nature and origin of males with XX sex chromosomes. American journal of human genetics 1972; 24(1): 71.

47. Wikström AM, Painter JN, Raivio T, Aittomäki K, Dunkel L. Genetic features of the X chromosome affect pubertal development and testicular degeneration in adolescent boys with Klinefelter syndrome. Clinical endocrinology 2006; 65(1): 92-97.

48. Nielsen J. A Psychiatric-psychological study of 50 severely hypogonadal male patients: including 34 with Klinefelter's syndrome 47, XXY. Universitetsforlaget i Aarhus og Munksgaard; 1969.

49. Aksglaede L, Molgaard C, Skakkebæk NE, Juul A. Normal bone mineral content but unfavourable muscle/fat ratio in Klinefelter syndrome. Archives of disease in childhood 2008; 93(1): 30-34.

50. Ferguson-Smith MA. Karyotype-phenotype correlations in gonadal dysgenesis and their bearing on the pathogenesis of malformations. Journal of Medical Genetics 1965; 2(2): 142.

51. Turner HH. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. Endocrinology 1938; 23(5): 566-574.

52. Sybert VP, McCauley E. Turner's syndrome. New England Journal of Medicine 2004; 351(12): 1227-1238.

53. Bondy CA. Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2007; 92(1): 10-25.

54. Batch J. Turner syndrome in childhood and adolescence. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2002; 16(3): 465-482.

55. Jung JY, Yang S, Jeong E-H, Lee H-C, Lee Y-M, Han H-S, ve ark. Mixed gonadal dysgenesis in 45, X Turner syndrome with SRY gene. Annals of pediatric endocrinology & metabolism 2015; 20(4): 226-229.

56. Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. American journal of human genetics 1977; 29(1): 94.

57. Kim K-R, Kwon Y, Joung JY, Kim KS, Ayala AG, Ro JY. True hermaphroditism and mixed gonadal dysgenesis in young children: a clinicopathologic study of 10 cases. Modern Pathology 2002; 15(10): 1013-1019.

58. Mendonca BB, Domenice S, Arnhold IJ, Costa EM. 46, XY disorders of sex development (DSD). Clinical endocrinology 2009; 70(2): 173-187.

59. Cools M, Drop SL, Wolffenbuttel KP, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new directions, moving frontiers. Endocrine reviews 2006; 27(5): 468-484.

60. Kersemaekers A-MF, Honecker F, Stoop H, Cools M, Molier M, Wolffenbuttel K, ve ark. Identification of germ cells at risk for neoplastic transformation in gonadoblastoma: an immunohistochemical study for OCT3/4 and TSPY. Human pathology 2005; 36(5): 512-521.

61. Berkovitz GD, Fechner PY, Zacur HW, Rock JA, Snyder III HM, Migeon CJ, ve ark. Clinical and pathologic spectrum of 46, XY gonadal dysgenesis: its relevance to the understanding of sex differentiation. Medicine 1991; 70(6): 375-383.

62. Cameron FJ, Sinclair AH. Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes. Human mutation 1997; 9(5): 388.

63. Diamond D, Caldamone A. The value of laparoscopy for 106 impalpable testes relative to clinical presentation. The Journal of urology 1992; 148(2 Pt 2): 632-634.

64. Hegarty PK, Mushtaq I, Sebire NJ. Natural history of testicular regression syndrome and consequences for clinical management. Journal of pediatric urology 2007; 3(3): 206-208.

65. Selby D. Sexual maldevelopment syndromes. Pediatric Pathology. Philadelphia, Pa: JB Lippincott Co 1992: 117-159.

66. Grady RW, Mitchell ME, Carr MC. Laparoscopic and histologic evaluation of the inguinal vanishing testis. Urology 1998; 52(5): 866-869.

67. Lou C, Lin J, Tung T, Wang K. Anatomical findings of the vanishing testis. Changgeng yi xue za zhi/Changgeng ji nian yi yuan= Chang Gung medical journal/Chang Gung Memorial Hospital 1994; 17(2): 121-124.

68. Cendron M, Schned AR, Ellsworth PI. Histological evaluation of the testicular nubbin in the vanishing testis syndrome. The Journal of urology 1998; 160(3): 1161-1163.

69. Elder J. Laparoscopy for impalpable testes: significance of the patent processus vaginalis. The Journal of urology 1994; 152(2 Pt 2): 776-778.

70. Koyama T, Nonomura K, Ameda K, Kakizaki H, Matsugase Y, Shinno Y, ve ark. Laparoscopic evaluation and the management of the nonpalpable testis. Diagnostic and therapeutic endoscopy 1997; 4(2): 69-74.

71. Storm D, Redden T, Aguiar M, Wilkerson M, Jordan G, Sumfest J. Histologic evaluation of the testicular remnant associated with the vanishing testes syndrome: is surgical management necessary? Urology 2007; 70(6): 1204-1206.

72. Bar-Maor J, Groisman G, Lam M. Antenatal torsion of the testes, a cause of vanishing testis syndrome. Pediatric surgery international 1993; 8(3): 236-238.

73. Papparella A, Zamparelli M, Cobellis G, Amici G, Saggiomo G, Parmeggiani P, ve ark. Laparoscopy for nonpalpable testis: is inguinal exploration always necessary when the cord structures enter the inguinal ring? Pediatric Endosurgery & Innovative Techniques 1999; 3(1): 29-33.

74. Mendonca BB, Costa EM, Belgorosky A, Rivarola MA, Domenice S. 46, XY DSD due to impaired androgen production. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2010; 24(2): 243-262.

75. Nes WD. Biosynthesis of cholesterol and other sterols. Chemical reviews 2011; 111(10): 6423-6451.

76. Herman GE. Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation syndromes. Human Molecular Genetics 2003; 12(suppl_1): R75-R88.

77. Nowaczyk MJ, Cunniff C. Smith–Lemli–Opitz syndrome and other disorders of cholesterol biosynthesis: An introduction. Paper presented at: American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics2012.

78. Bose HS, Sugawara T, Strauss JF, Miller WL. The pathophysiology and genetics of congenital lipoid adrenal hyperplasia. New England Journal of Medicine 1996; 335(25): 1870-1879.

79. Miller WL. Congenital lipoid adrenal hyperplasia: the human gene knockout for the steroidogenic acute regulatory protein. Journal of molecular endocrinology 1997; 19(3): 227-240.

80. Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. Endocrine reviews 1996; 17(3): 221-244.

81. Lin D, Sugawara T, Strauss III JF, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, ve ark. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON- 1995: 1828-1828.

82. Ogata T, Matsuo N, Saito M, Prader A. The testicular lesion and sexual differentiation in congenital lipoid adrenal hyperplasia. Helvetica paediatrica acta 1989; 43(5-6): 531-538.

83. King SR, Bhangoo A, Stocco DM. Functional and physiological consequences of StAR deficiency: role in lipoid congenital adrenal hyperplasia. Pediatric Adrenal Diseases. Vol 20: Karger Publishers; 2011:47-53.

84. Abdulhadi-Atwan M, Jean A, Chung WK, Meir K, Ben Neriah Z, Stratigopoulos G, ve ark. Role of a founder c. 201_202delCT mutation and new phenotypic features of congenital lipoid adrenal hyperplasia in Palestinians. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2007; 92(10): 4000-4008.

85. Baker BY, Lin L, Kim CJ, Raza J, Smith CP, Miller WL, ve ark. Nonclassic congenital lipoid adrenal hyperplasia: a new disorder of the steroidogenic acute regulatory

protein with very late presentation and normal male genitalia. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2006; 91(12): 4781-4785.

86. Kim CJ, Lin L, Huang N, Quigley CA, AvRuskin TW, Achermann JC, ve ark. Severe combined adrenal and gonadal deficiency caused by novel mutations in the cholesterol side chain cleavage enzyme, P450scc. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2008; 93(3): 696-702.

87. Metherell LA, Naville D, Halaby G, Begeot M, Huebner A, Nürnberg G, ve ark. Nonclassic lipoid congenital adrenal hyperplasia masquerading as familial glucocorticoid deficiency. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2009; 94(10): 3865-3871.

88. Sahakitrungruang T, Soccio RE, Lang-Muritano M, Walker JM, Achermann JC, Miller WL. Clinical, genetic, and functional characterization of four patients carrying partial loss-of-function mutations in the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2010; 95(7): 3352-3359.

89. Yoo H-W, Kim G-H. Molecular and clinical characterization of Korean patients with congenital lipoid adrenal hyperplasia. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism 1998; 11(6): 707-712.

90. Gucev ZS, Tee MK, Chitayat D, Wherrett DK, Miller WL. Distinguishing deficiencies in the steroidogenic acute regulatory protein and the cholesterol side chain cleavage enzyme causing neonatal adrenal failure. The Journal of pediatrics 2013; 162(4): 819-822.

91. Tajima T, Fujieda K, Kouda N, Nakae J, Miller WL. Heterozygous mutation in the cholesterol side chain cleavage enzyme (p450scc) gene in a patient with 46, XY sex reversal and adrenal insufficiency. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2001; 86(8): 3820-3825.

92. Csapo AI, Pulkkinen MO, Wiest W. Effects of luteectomy and progesterone replacement therapy in early pregnant patients. American journal of obstetrics and gynecology 1973; 115(6): 759-765.

93. Miller WL. Why Nobody Has P450scc (20, 22 Desmoslase) Deficiency g. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 1998; 83(4): 1399-1400.

94. Saez J, De Peretti E, Morera A, David M, Bertrand J. Familial male pseudohermaphroditism with gynecomastia due to a testicular 17-ketosteroid reductase defect. I. Studies in vivo. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 1971; 32(5): 604-610.

95. Mendonca BB, Inacio M, Arnhold IJ, Costa EM, Bloise W, Martin RM, ve ark. Male Pseudohermaphroditism due to 17 [beta]-Hydroxysteroid Dehydrogenase 3 Deficiency: Diagnosis, Psychological Evaluation, and Management. Medicine 2000; 79(5): 299-309.

96. George MM, New MI, Ten S, Sultan C, Bhangoo A. The clinical and molecular heterogeneity of 17βHSD-3 enzyme deficiency. Hormone research in paediatrics 2010; 74(4): 229-240.

97. Dumić M, Plavšić V, Fattorini I, Ille J. Absent spermatogenesis despite early bilateral orchidopexy in 17-ketoreductase deficiency. Hormone Research in Paediatrics 1985; 22(1-2): 100-106.

98. Shackleton C, Malunowicz E. Apparent pregnene hydroxylation deficiency (APHD): seeking the parentage of an orphan metabolome. Steroids 2003; 68(9): 707-717.

99. Miller WL, Huang N, Agrawal V, Giacomini KM. Genetic variation in human P450 oxidoreductase. Molecular and cellular endocrinology 2009; 300(1): 180-184.

100. Flück CE, Tajima T, Pandey AV, Arlt W, Okuhara K, Verge CF, ve ark. Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. Nature genetics 2004; 36(3): 228-230.

101. Huang N, Agrawal V, Giacomini KM, Miller WL. Genetics of P450 oxidoreductase: sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations. Proceedings of the National Academy of Sciences 2008; 105(5): 1733-1738.

102. Pandey AV, Kempná P, Hofer G, Mullis PE, Flück CE. Modulation of human CYP19A1 activity by mutant NADPH P450 oxidoreductase. Molecular endocrinology 2007; 21(10): 2579-2595.

103. Miller WL. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. Endocrinology 2005; 146(6): 2544-2550.

104. Tee MK, Huang N, Damm I, Miller WL. Transcriptional regulation of the human P450 oxidoreductase gene: hormonal regulation and influence of promoter polymorphisms. Molecular Endocrinology 2011; 25(5): 715-731.

105. Idkowiak J, O'riordan S, Reisch N, Malunowicz EM, Collins F, Kerstens MN, ve ark. Pubertal presentation in seven patients with congenital adrenal hyperplasia due to P450 oxidoreductase deficiency. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2010; 96(3): E453-E462.

106. Dharia S, Slane A, Jian M, Conner M, Conley AJ, Parker Jr CR. Colocalization of P450c17 and cytochrome b5 in androgen-synthesizing tissues of the human. Biology of reproduction 2004; 71(1): 83-88.

107. Idkowiak J, Cragun D, Hopkin RJ, Arlt W. Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. 2017.

108. Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. Steroid 5α-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. Science 1974: 1213-1215.

109. Nowakowski H, Lenz W. Genetic aspects in male hypogonadism. Recent progress in hormone research 1961; 17: 53-95.

110. Walsh PC, Madden JD, Harrod MJ, Goldstein JL, MacDonald PC, Wilson JD. Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2: decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. New England Journal of Medicine 1974; 291(18): 944-949.

111. Imperato-McGinley J, Zhu Y-S. Androgens and male physiology the syndrome of 5α-reductase-2 deficiency. Molecular and cellular endocrinology 2002; 198(1): 51-59.

112. https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=srd5a2.

113. Gottlieb B, Trifiro MA. Androgen insensitivity syndrome. 2017.

114. Morris JM. The syndrome of testicular feminization in male pseudohermaphrodites. American journal of obstetrics and gynecology 1953; 65(6): 1192-1211.

115. Brown C, Goss S, Lubahn D, Joseph D, Wilson E, French F, ve ark. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. American journal of human genetics 1989; 44(2): 264.

116. Brown TR, Lubahn DB, Wilson EM, Joseph DR, French FS, Migeon CJ. Deletion of the steroid-binding domain of the human androgen receptor gene in one family with complete androgen insensitivity syndrome: evidence for further genetic heterogeneity in this syndrome. Proceedings of the National Academy of Sciences 1988; 85(21): 8151-8155.

117. Hughes IA, Werner R, Bunch T, Hiort O. Androgen insensitivity syndrome. Paper presented at: Seminars in reproductive medicine2012.

118. Lee DK, Chang C. Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2003; 88(9): 4043-4054.

119. Mhatre AN, Trifiro MA, Kaufman M, Kazemi-Esfarjani P, Figlewicz D, Rouleau G, ve ark. Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X–linked spinal and bulbar muscular atrophy. Nature genetics 1993; 5(2): 184-188.

120. Brinkmann AO. Molecular basis of androgen insensitivity. Molecular and cellular endocrinology 2001; 179(1): 105-109.

121. Galani A, Kitsiou-Tzeli S, Sofokleous C, Kanavakis E, Kalpini-Mavrou A. Androgen insensitivity syndrome: clinical features and molecular defects. Hormones (Athens) 2008; 7(3): 217-229.

122. Hiort O, Holterhus P-M, Horter T, Schulze W, Kremke B, Bals-Pratsch M, ve ark. Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2000; 85(8): 2810-2815.

123. McPhaul MJ, Griffin JE. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of the human androgen receptor. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 1999; 84(10): 3435-3441.

124. Boehmer AL, Brüggenwirth H, van Assendelft C, Otten BJ, Verleun-Mooijman MC, Niermeijer MF, ve ark. Genotype versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2001; 86(9): 4151-4160.

125. Chen M-J, Vu B, Axelrad M, Dietrich JE, Gargollo P, Gunn S, ve ark. Androgen Insensitivity Syndrome: Management Considerations from Infancy to Adulthood. Pediatric endocrinology reviews: PER 2015; 12(4): 373-387.

126. Alves C, Braid Z, Coeli FB, Mello MPd. 46, XX Male-Testicular Disorder of Sexual Differentiation (DSD): hormonal, molecular and cytogenetic studies. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia 2010; 54(8): 685-689.

127. Vorona E, Zitzmann M, Gromoll Jr, Schüring AN, Nieschlag E. Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46, XX male syndrome, compared with 47, XXY Klinefelter patients. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2007; 92(9): 3458-3465.

128. 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. Proceedings of the National Academy of Sciences 1993; 90(8): 3368-3372.

129. Délot EC, Vilain EJ. Nonsyndromic 46, XX testicular disorders of sex development. 2015.

130. de la Chapelle A. The etiology of maleness in XX men. Human genetics 1981; 58(1): 105-116.

131. Cox JJ, Willatt L, Homfray T, Woods CG. A SOX9 duplication and familial 46, XX developmental testicular disorder. New England Journal of Medicine 2011; 364(1): 91-93.

132. Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. American journal of medical genetics 1999; 87(4): 349-353.

133. Kim G-J, Sock E, Buchberger A, Just W, Denzer F, Hoepffner W, ve ark. Copy number variation of two separate regulatory regions upstream of SOX9 causes isolated 46, XY or 46, XX disorder of sex development. Journal of medical genetics 2015: jmedgenet-2014-102864.

134. Refai O, Friedman A, Terry L, Jewett T, Pearlman A, Perle MA, ve ark. De novo 12; 17 translocation upstream of SOX9 resulting in 46, XX testicular disorder of sex development. American Journal of Medical Genetics Part A 2010; 152(2): 422-426.

135. Vetro A, Ciccone R, Giorda R, Patricelli MG, Della Mina E, Forlino A, ve ark. XX males SRY negative: a confirmed cause of infertility. Journal of medical genetics 2011: jmedgenet-2011-100036.

136. Xiao B, Ji X, Xing Y, Chen Y-w, Tao J. A rare case of 46, XX SRY-negative male with a~ 74-kb duplication in a region upstream of SOX9. European journal of medical genetics 2013; 56(12): 695-698.

137. Nimkarn S, Gangishetti PK, Yau M, New MI. 21-Hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. 2016.

138. Nimkarn S, Lin-Su K, Berglind N, Wilson RC, New MI. Aldosterone-to-renin ratio as a marker for disease severity in 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2007; 92(1): 137-142.

139. Van Der Kamp HJ, Wit JM. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. European journal of endocrinology 2004; 151(Suppl 3): U71-U75.

140. Vogeser M, Zachoval R, Felbinger T, Jacob K, Radetti G, Bona G, ve ark. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the European society for paediatric endocrinology and the Lawson Wilkins pediatric endocrine society. Hormone Research in Paediatrics 2002; 58(4): 188-195.

141. Escobar-Morreale HcF, Sanchón R, San Millán JL. A prospective study of the prevalence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia among women presenting with hyperandrogenic symptoms and signs. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2008; 93(2): 527-533.

142. Fanta M, Cibula D, Vrbikova J. Prevalence of nonclassic adrenal hyperplasia (NCAH) in hyperandrogenic women. Gynecological Endocrinology 2008; 24(3): 154-157.

143. Kashimada K-I, Ono M, Onishi T, Koyama S, Toyoura T, Imai K, ve ark. Clinical course of patients with nonclassical 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) diagnosed in infancy and childhood. Endocrine journal 2008; 55(2): 397-404.

144. New MI. Nonclassical 21-hydroxylase deficiency. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2006; 91(11): 4205-4214.

145. Pang S, Pollack MS, Marshall RN, Immken L. Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. New England Journal of Medicine 1990; 322(2): 111-115.

146. Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Hiromasa T, Fujii-Kuriyama Y. Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450 (C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. Proceedings of the National Academy of Sciences 1988; 85(20): 7486-7490.

147. Tusie-Luna M-T, White PC. Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms. Proceedings of the National Academy of Sciences 1995; 92(23): 10796-10800.

148. Wedell A. Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency): implications for diagnosis, prognosis and treatment. Acta Paediatrica 1998; 87(2): 159-164.

149. White PC, Vitek A, Dupont B, New MI. Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. Proceedings of the National Academy of Sciences 1988; 85(12): 4436-4440.

150. .

151. Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2000; 85(3): 1059-1065.

152. Belgorosky A, Guercio G, Pepe C, Saraco N, Rivarola M. Genetic and clinical spectrum of aromatase deficiency in infancy, childhood and adolescence. Hormone Research in Paediatrics 2009; 72(6): 321-330.

153. Wallach EE, McClamrock HD, Adashi EY. Gestational hyperandrogenism. Fertility and sterility 1992; 57(2): 257-274.

154. Ahmed SF, Rodie M. Investigation and initial management of ambiguous genitalia. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2010; 24(2): 197-218.

155. Ahmed SF, Achermann JC, Arlt W, Balen AH, Conway G, Edwards ZL, ve ark. UK guidance on the initial evaluation of an infant or an adolescent with a suspected disorder of sex development. Clinical endocrinology 2011; 75(1): 12-26.

156. Ahmed S, Cheng A, Hughes I. Assessment of the gonadotrophin–gonadal axis in androgen insensitivity syndrome. Archives of Disease in Childhood 1999; 80(4): 324-329.

157. Ahmed SF, Khwaja O, Hughes IA. The role of a clinical score in the assessment of ambiguous genitalia. BJU international 2000; 85(1): 120-124.

158. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. Endocrine reviews 1995; 16(3): 271-321.

159. Prader A. Genital findings in the female pseudo-hermaphroditism of the congenital adrenogenital syndrome; morphology, frequency, development and heredity of the different genital forms. Helvetica paediatrica acta 1954; 9(3): 231-248.

160. Klug W, Cummings M. Concepts of Genetics, Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey 2000.

161. Consortium EP. The ENCODE (ENCyclopedia of DNA elements) project. Science 2004; 306(5696): 636-640.

162. Bainbridge MN, Wiszniewski W, Murdock DR, Friedman J, Gonzaga-Jauregui C, Newsham I, ve ark. Whole-genome sequencing for optimized patient management. Science translational medicine 2011; 3(87): 87re83-87re83.

163. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, ve ark. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. Nature 2009; 461(7261): 272-276.

164. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes JC, ve ark. Nucleotide sequence of bacteriophage φX174 DNA. nature 1977; 265(5596): 687-695.

165. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, ve ark. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC genomics 2012; 13(1): 341.

166. Fan J-B, Chee MS, Gunderson KL. Highly parallel genomic assays. Nature Reviews Genetics 2006; 7(8): 632-644.

167. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. Proceedings of the National Academy of Sciences 2003; 100(15): 8817-8822.

168. Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. Nucleic acids research 2006; 34(3): e22-e22.

169. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nature biotechnology 2008; 26(10): 1135-1145.

170. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, ve ark. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. Science 2009; 323(5910): 133-138.

171. Metzker ML. Sequencing technologies—the next generation. Nature reviews genetics 2010; 11(1): 31-46.

172. Berglund EC, Kiialainen A, Syvanen A-C. Investigative Genetics. 2011.

173. Goodwin S, Gurtowski J, Ethe-Sayers S, Deshpande P, Schatz MC, McCombie WR. Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and de novo assembly of a eukaryotic genome. Genome research 2015; 25(11): 1750-1756.

174. Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. Human molecular genetics 2010; 19(R2): R227-R240.

175. Branton D, Deamer DW, Marziali A, Bayley H, Benner SA, Butler T, ve ark. The potential and challenges of nanopore sequencing. Nature biotechnology 2008; 26(10): 1146-1153.

176. Derrington IM, Butler TZ, Collins MD, Manrao E, Pavlenok M, Niederweis M, ve ark. Nanopore DNA sequencing with MspA. Proceedings of the National Academy of Sciences 2010; 107(37): 16060-16065.

177. Howorka S, Cheley S, Bayley H. Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores. Nature biotechnology 2001; 19(7): 636-639.

178. Krivanek OL, Chisholm MF, Nicolosi V, Pennycook TJ, Corbin GJ, Dellby N, ve ark. Atom-by-atom structural and chemical analysis by annular dark-field electron microscopy. Nature 2010; 464(7288): 571-574.

179. Luan B, Peng H, Polonsky S, Rossnagel S, Stolovitzky G, Martyna G. Base-by-base ratcheting of single stranded DNA through a solid-state nanopore. Physical review letters 2010; 104(23): 238103.

180. McNally B, Singer A, Yu Z, Sun Y, Weng Z, Meller A. Optical recognition of converted DNA nucleotides for single-molecule DNA sequencing using nanopore arrays. Nano letters 2010; 10(6): 2237-2244.

181. Polonsky S, Rossnagel S, Stolovitzky G. Nanopore in metal-dielectric sandwich for DNA position control. Applied Physics Letters 2007; 91(15): 153103.

182. Stoddart D, Heron AJ, Mikhailova E, Maglia G, Bayley H. Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. Proceedings of the National Academy of Sciences 2009; 106(19): 7702-7707.

183. Zwolak M, Krems M, Pershin YV, Di Ventra M. Effect of dephasing on DNA sequencing via transverse electronic transport. Los Alamos National Laboratory (LANL);2009. 0006-3495.

184. Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? Journal of medical genetics 2011; 48(9): 580-589.

185. Lennon NJ, Adalsteinsson VA, Gabriel SB. Technological considerations for genome-guided diagnosis and management of cancer. Genome medicine 2016; 8(1): 112.

186. Frebourg T. The challenge for the next generation of medical geneticists. Hum Mutat 2014; 35(8): 909-911.

187. Tucker T, Marra M, Friedman JM. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. Am J Hum Genet 2009; 85(2): 142-154.

188. Voelkerding KV, Dames S, Durtschi JD. Next generation sequencing for clinical diagnostics-principles and application to targeted resequencing for hypertrophic cardiomyopathy: a paper from the 2009 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. J Mol Diagn 2010; 12(5): 539-551.

189. Su Z, Ning B, Fang H, Hong H, Perkins R, Tong W, ve ark. Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics. Expert Rev Mol Diagn 2011; 11(3): 333-343.

190. Merriman B, Torrent I, Rothberg JM, Team D. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. Electrophoresis 2012; 33(23): 3397-3417.

191. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, ve ark. Integrative genomics viewer. Nature biotechnology 2011; 29(1): 24-26.

192. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic acids research 2002; 30(12): e57-e57.

193. https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=map3k1.

194. Amberger J, Bocchini CA, Scott AF, Hamosh A. McKusick's online Mendelian inheritance in man (OMIM®). Nucleic acids research 2008; 37(suppl_1): D793-D796.

195. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, ve ark. The human genome browser at UCSC. Genome research 2002; 12(6): 996-1006.

196. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, ve ark. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. Nucleic acids research 2013; 42(D1): D980-D985.

197. Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, Lancet D. GeneCards: integrating information about genes, proteins and diseases. Trends in Genetics 1997; 13(4): 163.

198. Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B, Solomonson M, Ruderfer DM, Kavanagh D, ve ark. The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. Nucleic acids research 2016; 45(D1): D840-D845.

199. Scott EM, Halees A, Itan Y, Spencer EG, He Y, Azab MA, ve ark. Characterization of Greater Middle Eastern genetic variation for enhanced disease gene discovery. Nature genetics 2016; 48(9): 1071-1076.

200. Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. A protocol for computer-based protein structure and function prediction. Journal of visualized experiments: JoVE 2011; (57).

201. Ahmed S, Bashamboo A, Lucas-Herald A, McElreavey K. Understanding the genetic aetiology in patients with XY DSD. British medical bulletin 2013; 106(1): 67-89.

202. Krishnan S, Wisniewski AB. Ambiguous Genitalia in Newborns. Genetic Steroid Disorders 2013: 87.

203. Croft B, Ayers K, Sinclair A, Ohnesorg T. Review disorders of sex development: The evolving role of genomics in diagnosis and gene discovery. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews 2016; 108(4): 337-350.

204. Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, ve ark. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. European Journal of Human Genetics 2016; 24(1): 2-5.

205. Barbaro M, Cicognani A, Balsamo A, Löfgren Å, Baldazzi L, Wedell A, ve ark. Gene dosage imbalances in patients with 46, XY gonadal DSD detected by an in-house-designed synthetic probe set for multiplex ligation-dependent probe amplification analysis. Clinical genetics 2008; 73(5): 453-464.

206. Barbaro M, Cools M, Looijenga L, Drop S, Wedell A. Partial deletion of the NR5A1 (SF1) gene detected by synthetic probe MLPA in a patient with XY gonadal disorder of sex development. Sexual Development 2011; 5(4): 181-187.

207. White S, Ohnesorg T, Notini A, Roeszler K, Hewitt J, Daggag H, ve ark. Copy number variation in patients with disorders of sex development due to 46, XY gonadal dysgenesis. PloS one 2011; 6(3): e17793.

208. Tannour-Louet M, Han S, Corbett ST, Louet J-F, Yatsenko S, Meyers L, ve ark. Identification of de novo copy number variants associated with human disorders of sexual development. PloS one 2010; 5(10): e15392.

209. Ledig S, Hiort O, Scherer G, Hoffmann M, Wolff G, Morlot S, ve ark. Array-CGH analysis in patients with syndromic and non-syndromic XY gonadal dysgenesis: evaluation of array CGH as diagnostic tool and search for new candidate loci. Human reproduction 2010; 25(10): 2637-2646.

210. Norling A, Hirschberg AL, Iwarsson E, Persson B, Wedell A, Barbaro M. Novel candidate genes for 46, XY gonadal dysgenesis identified by a customized 1 M array-CGH platform. European journal of medical genetics 2013; 56(12): 661-668.

211. Sutton E, Hughes J, White S, Sekido R, Tan J, Arboleda V, ve ark. Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. The Journal of clinical investigation 2011; 121(1): 328.

212. Singh R, Patel K, Routbort M, Aldape K, Lu X, Manekia J, ve ark. Clinical massively parallel next-generation sequencing analysis of 409 cancer-related genes for mutations and copy number variations in solid tumours. British journal of cancer 2014; 111(10).

213. Arboleda V, Lee H, Sánchez F, Délot E, Sandberg D, Grody W, ve ark. Targeted massively parallel sequencing provides comprehensive genetic diagnosis for patients with disorders of sex development. Clinical genetics 2013; 83(1): 35-43.

214. Dong Y, Yi Y, Yao H, Yang Z, Hu H, Liu J, ve ark. Targeted next-generation sequencing identification of mutations in patients with disorders of sex development. BMC medical genetics 2016; 17(1): 23.

215. Eggers S, Sadedin S, van den Bergen JA, Robevska G, Ohnesorg T, Hewitt J, ve ark. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. Genome biology 2016; 17(1): 243.

216. Baxter RM, Arboleda VA, Lee H, Barseghyan H, Adam MP, Fechner PY, ve ark. Exome sequencing for the diagnosis of 46, XY disorders of sex development. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2015; 100(2): E333-E344.

217. Baetens D, Stoop H, Peelman F, Todeschini A-L, Rosseel T, Coppieters F, ve ark. NR5A1 is a novel disease gene for 46, XX testicular and ovotesticular disorders of sex development. Genetics in Medicine 2017; 19(4): 367.

218. Özen S, Onay H, Atik T, Solmaz AE, Özkınay F, Gökşen D, ve ark. Rapid Molecular Genetic Diagnosis with Next-Generation Sequencing in 46, XY Disorders of Sex Development Cases: Efficiency and Cost Assessment. Hormone research in paediatrics 2017; 87(2): 81-87.

219. Barrionuevo FJ, Burgos M, Scherer G, Jiménez R. Genes promoting and disturbing testis development. Histol Histopathol 2012; 27(11): 1361-1383.

220. Akcay T, Fernandez-Cancio M, Turan S, Güran T, Audi L, Bereket A. AR and SRD5A2 gene mutations in a series of 51 Turkish 46, XY DSD children with a clinical diagnosis of androgen insensitivity. Andrology 2014; 2(4): 572-578.

221. Yang Z, Ye L, Wang W, Zhao Y, Wang W, Jia H, ve ark. 17β-Hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency: Three case reports and a systematic review. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 2017; 174: 141-145.

222. Boehmer AL, Brinkmann AO, Sandkuijl LA, Halley DJ, Niermeijer MF, Andersson S, ve ark. 17β-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency: diagnosis, phenotypic variability, population genetics, and worldwide distribution of ancient and de novo mutations. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 1999; 84(12): 4713-4721.

223. Xiong HY, Alipanahi B, Lee LJ, Bretschneider H, Merico D, Yuen RK, ve ark. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. Science 2015; 347(6218): 1254806.

224. Hiort O, Marshall L, Birnbaum W, Wünsch L, Holterhus P-M, Döhnert U, ve ark. Pubertal Development in 17Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 3 Deficiency. Hormone research in paediatrics 2017; 87(5): 354-358.

225. Phelan N, Williams EL, Cardamone S, Lee M, Creighton SM, Rumsby G, ve ark. Screening for mutations in 17β-hydroxysteroid dehydrogenase and androgen receptor in women presenting with partially virilised 46, XY disorders of sex development. European journal of endocrinology 2015; 172(6): 745-751.

226. Shammas C, Neocleous V, Toumba M, Costi C, Phedonos AA, Efstathiou E, ve ark. Overview of genetic defects in endocrinopathies in the island of Cyprus; evidence of a founder effect. Genetic testing and molecular biomarkers 2012; 16(9): 1073-1079.

227. Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendonca BB, ve ark. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17β–hydroxysteroid dehydrogenase 3. Nature genetics 1994; 7(1): 34-39.

228. Moghrabi N, Hughes IA, Dunaif A, Andersson S. Deleterious missense mutations and silent polymorphism in the human 17β-hydroxysteroid dehydrogenase 3 gene (HSD17B3). The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 1998; 83(8): 2855-2860.

229. Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. Nature reviews Molecular cell biology 2004; 5(2): 89-99.

230. Köhler B, Lin L, Ferraz-de-Souza B, Wieacker P, Heidemann P, Schröder V, ve ark. Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46, XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency. Human mutation 2008; 29(1): 59-64.

231. Domenice S, Zamboni Machado A, Moraes Ferreira F, Ferraz-de-Souza B, Marcondes Lerario A, Lin L, ve ark. Wide spectrum of NR5A1-related phenotypes in 46, XY and 46, XX individuals. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews 2016; 108(4): 309-320.

232. Ferraz-de-Souza B, Lin L, Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. Molecular and cellular endocrinology 2011; 336(1): 198-205.

233. Allali S, Muller J-B, Brauner R, Lourenço D, Boudjenah R, Karageorgou V, ve ark. Mutation analysis of NR5A1 encoding steroidogenic factor 1 in 77 patients with 46, XY disorders of sex development (DSD) including hypospadias. PloS one 2011; 6(10): e24117.

234. Lin L, Achermann J. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. Sexual Development 2008; 2(4-5): 200-209.

235. Hmida IBH, Mougou-Zerelli S, Hadded A, Dimassi S, Kammoun M, Bignon-Topalovic J, ve ark. Novel homozygous nonsense mutations in the luteinizing hormone receptor (LHCGR) gene associated with 46, XY primary amenorrhea. Fertility and sterility 2016; 106(1): 225-229. e211.

236. Latronico AC, Anasti J, Arnhold IJ, Rapaport R, Mendonca BB, Bloise W, ve ark. Testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone–receptor gene. New England Journal of Medicine 1996; 334(8): 507-512.

237. Latronico AC, Arnhold IJ. Inactivating mutations of the human luteinizing hormone receptor in both sexes. Paper presented at: Seminars in reproductive medicine2012.

238. Reddy JC, Licht JD. The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: how much do we really know? Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer 1996; 1287(1): 1-28.

239. Royer-Pokora B, Beier M, Henzler M, Alam R, Schumacher V, Weirich A, ve ark. Twenty-four new cases of WT1 germline mutations and review of the literature: genotype/phenotype correlations for Wilms tumor development. American Journal of Medical Genetics Part A 2004; 127(3): 249-257.

240. Barrera LA, Vedenko A, Kurland JV, Rogers JM, Gisselbrecht SS, Rossin EJ, ve ark. Survey of variation in human transcription factors reveals prevalent DNA binding changes. Science 2016; 351(6280): 1450-1454.

241. Bruening W, Bardeesy N, Silverman BL, Cohn RA, Machin GA, Aronson AJ, ve ark. Germline intronic and exonic mutations in the Wilms' tumour gene (WT1) affecting urogenital development. Nature genetics 1992; 1(2): 144-148.

242. Flück CE, Mallet D, Hofer G, Samara-Boustani D, Leger J, Polak M, ve ark. Deletion of P399_E401 in NADPH cytochrome P450 oxidoreductase results in partial mixed oxidase deficiency. Biochemical and biophysical research communications 2011; 412(4): 572-577.

243. Bashamboo A, Brauner R, Bignon-Topalovic J, Lortat-Jacob S, Karageorgou V, Lourenco D, ve ark. Mutations in the FOG2/ZFPM2 gene are associated with anomalies of human testis determination. Human molecular genetics 2014; 23(14): 3657-3665.

244. Longoni M, Russell M, High F, Darvishi K, Maalouf F, Kashani A, ve ark. Prevalence and penetrance of ZFPM2 mutations and deletions causing congenital diaphragmatic hernia. Clinical genetics 2015; 87(4): 362-367.

245. D'Alessandro LC, Al Turki S, Manickaraj AK, Manase D, Mulder BJ, Bergin L, ve ark. Exome sequencing identifies rare variants in multiple genes in atrioventricular septal defect. Genetics in Medicine 2016; 18(2): 189.

246. Chen T, Li Q, Xu J, Ding K, Wang Y, Wang W, ve ark. Mutation screening of BMP4, BMP7, HOXA4 and HOXB6 genes in Chinese patients with hypospadias. European Journal of Human Genetics 2007; 15(1): 23-28.

247. Akcan N, Poyrazoglu S, Bas F, Bundak R, Darendeliler F, Akcan N. UNCORRECTED.

248. Assumpcao J, Ferraz LC, Benedetti C, Maciel-Guerra A, Guerra G, Marques-de-Faria A, ve ark. A naturally occurring deletion in the SRY promoter region affecting the Sp1 binding site is associated with sex reversal. Journal of endocrinological investigation 2005; 28(9): 651-656.

249. Calvari V, Bertini V, De Grandi A, Peverali G, Zuffardi O, Ferguson-Smith M, ve ark. A new submicroscopic deletion that refines the 9p region for sex reversal. Genomics 2000; 65(3): 203-212.

250. Smyk M, Berg JS, Pursley A, Curtis FK, Fernandez BA, Bien-Willner GA, ve ark. Male-to-female sex reversal associated with an∼ 250 kb deletion upstream of NR0B1 (DAX1). Human genetics 2007; 122(1): 63-70.

251. Känsäkoski J, Jääskeläinen J, Jääskeläinen T, Tommiska J, Saarinen L, Lehtonen R, ve ark. Complete androgen insensitivity syndrome caused by a deep intronic pseudoexon-activating mutation in the androgen receptor gene. Scientific reports 2016; 6: 32819.

252. Gimelli G, Giorda R, Beri S, Gimelli S, Zuffardi O. A 46, X, inv (Y) young woman with gonadal dysgenesis and gonadoblastoma: cytogenetics, molecular, and methylation studies. American Journal of Medical Genetics Part A 2006; 140(1): 40-45.

253. Nishino K, Hattori N, Tanaka S, Shiota K. DNA methylation-mediated control of Sry gene expression in mouse gonadal development. Journal of Biological Chemistry 2004; 279(21): 22306-22313.

HAM VERİLER

FORMLAR

(EK-2) Aydınlatılmış Onam Formu.

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
(tel: 0212 414 2000/ 32564-32327-35067)

MOLEKÜLER ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Proje Adı: Cinsiyet Gelişim Bozuklukları İle İlişkili Genlerin Yeni Nesil Dizileme Tekniği İle Araştırılması

Bu araştırma, Cinsiyet Gelişim Bozukluğu olan olgu ve ailelerinde tanıyı kesinleştirmek için gerekli genetik testlerin optimize edilerek klinik tanıda kullanılmasını amaçlamaktadır. Bu genetik hastalığa yol açan yüzlerce gen vardır ve her ailede bunlardan hangisinin sorumlu olduğunu belirlemek tedavi, erken tanı ve prenatal/preimplantasyon tanı için gereklidir. Çalışma, İstanbul Tıp Fakültesinde Tıbbi Genetik Anabilim Dalında yürütülecektir. Hastalarda periferik kan örneklerinde çalışma yapılacaktır. Proje için ayrıca bir girişim yapılmayacaktır.Bu çalışmaya katılmaya karar vermeden önce sizleri çalışmanın riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz. **Moleküler Araştırmalar için Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formunu** okuduktan sonra çalışmaya katılma kararı verirseniz lütfen formu imzalayınız.

1. Projeye Katılım için Gerekli Kriterler;

Projeye katılım için en önemli kriter "Cinsiyet Gelişim Bozukluğu" klinik tanısı konulmuş olmasıdır.

2. Yapılacak işlemin tanımı:

Klinik değerlendirmede "Cinsiyet Gelişim Bozukluğu" ön tanısı konulduğunda, genetik testler yaklaşık 2 ml periferik kan örneği alınması gerekecektir. Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir ve gönüllü katılım esastır.

3. Örnek Alımının Olası riskleri:

Periferik Kan Örneği alımı;

Rutin testler amacıyla kan örnekleri alınırken K_3EDTA lı mor kapaklı tüpe alınan örneğin 2 ml si bu çalışma amacıyla kullanılacaktır. Bu işleme bağlı; (1) İğne-batması sırasında hafif bir acı duyulabilir, (2) iğne batması sonrasında çok nadiren de olsa enfeksiyon gelişebilir.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Yapılacak testler, sizin ve ailenizdeki diğer bireylerin gelecekte bu genetik hastalıktan etkileneceğini ortaya çıkarabilir ve bu bilgi sizde psikolojik sorun yaratabilir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar ancak sizlerin istemeniz durumunda ve istediğiniz zamanda sizlerle paylaşılacaktır. Fakat bu bilgiyi öğrenmeyi tamamen reddetmek de hakkınızdır. Bu çalışma ile elde edilecek genetik bilgiler kesinlikle gizli kalacaktır ve 3. taraflarla paylaşılmayacaktır, bilginin paylaşımı sadece sizin izninize bağlı olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne yada babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır. Size ait kan ve doku örnekleri sadece bu proje için kullanılacaktır.

Çocuklarla ilgili açıklamalar: Çalışmalarımız sonlandığında çocuklarınızın hastalıkla ilişkili mutasyonu taşıdığını ve bunun ilerdeki kuşaklar için bir risk oluşturduğunu bulabiliriz. Bu bulgularımız çocuklara erişkin çağa ulaşıncaya kadar anlatılmayacak ve onlarla tartışılmayacaktır. Erişkin dönemlerinde kendi arzuları doğrultusunda bilgilendirme yapılarakgenetik danışma almaları sağlanacaktır. Bu açıklamalar doğrultusunda çocuğunuzun bu çalışmaya katılması için tercihen her iki ebeveynin, eğer mevcut değilse bir tanesinin izin formunu imzalaması gerekmektedir.

Olası yararlar: Bu çalışmanın esas amacı ailenizde saptanan genetik hastalığa neden olan genetik faktörleri öğrenmektir. Biz bu aşamada yapılacak testlerin, size veya çocuğunuza doğrudan ya da dolaylı bir yararının olup olmayacağını henüz bilmiyoruz. Fakat kesin olan bu hastalığın nedenleri konusunda daha çok şey öğrenebileceğimiz ve böylece gelecekte bu tür hastalara daha çok yardımcı olabileceğimizdir.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekme hakkına da sahipsiniz.

- **Hastanın/Katılımcının Beyanı**

Sayın Dr..... tarafından ..... (kurum adı)..... (anabilim dalı adı, ünite adı vb.)'da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr.Z. Oya Uyguner'i "+902124142000/32327-32347 nolu telefon ve İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı "dan arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Cinsiyet Gelişim Bozuklukları Hastalıklarında Genetik Tanı Yöntemleriningeliştirilmesiaraştırması kapsamında alınan biyolojik örneklerimin;

- Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum
- İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum
- Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası

Tarih :

İmzası:

Katılımcıların:	Adı Soyadı	Doğum tarih	İmza	Ebeveyn
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				
Aile üyesi				

*Araştırma amaçlı DNA için kan alınan hastalara imzalatılmalıdır.

(EK-3) Olgu Takip Formu.

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ TIBBİ GENETİK ABD

Cinsiyet Gelişim Bozukluklarında Yeni Nesil Dizileme Tabanlı Panel-Gen Testi

Hasta Kabul Ve Takip Formu

KİMLİK BİLGİLERİ

Adı, Soyadı : **Protokol veya TC no :**

Cinsiyet (yetiştirildiği) : **Doğum tarihi :**

Başvuru tarihi, yaşı : **Memleketi :**

Adres ve Tel :

FORMUN DOLDURULMA TARİHİ / DR. ..... / .....

TANI :

EK TANI :

BAŞVURU YAKINMASI VE ÖYKÜSÜ:

ÖZGEÇMİŞ

<u>Doğum öyküsü</u>

Gebelik sırasında sorun (hastalık, ilaç kullanımı vb) :

Gebelik haftası : **Doğum şekli :** **Doğum tartısı :**

Doğum boyu : **Baş çevresi :** **Prenatal asfiksi :** **Diğer:**

Nöromotor gelişim :

Geçirdiği hastalıklar :

AİLE ÖYKÜSÜ

Akraba evliliği :

Ailede hastalık öyküsü :

İnfertilite ***Hirşutizm*** ***Diğer***

Ailede benzer olgu:

(varsa aile ağacı üzerinde gösterip ayrıntılı bilgi veriniz.)

Aile ağacı :

MUAYENE BİLGİLERİ

Yaş : **Ağırlık / Ağırlık SDS :** **Boy/ Boy SDS :**

Puberte durumu (Ak., Pk., Meme, Testis) :

AIS evre : **EMS :** **IMS :**

*Dış genital muayene (tanı sırasında, ayrıntılı açıklama) vagen ağzı, görünüm, labioskrotal yaprakların durumu, fallus boyu, hipospodias şekli, gonadların yeri (inguinal, scrotal, batın vb)

Klitoris	
Ürogenital sinüs	
Labia major	
İnguinal Labia kitle	
Aksiller kıllanma	
Pubik kıllanma	
Meme gelişimi	

LABORATUAR

LH		DHT	
FSH		AMH	
Testosteron		İnhibin-B	
Estradiol		ACTH	
Androstenedion		PRA/Aldosteron	
DHEA-S		Elektrolitler	
17-OH PG		Kan şekeri	
Progesteron		Diğer	
Kortizol			

HCG uyarı testi sonucu :

Tarih

	Testosteron	**DHT**	**T/DHT**	**AS**	**DHEA-S**	**17-OH PG**	**PG**
Bazal							
Uyarı sonrası							

Tarih

	Testosteron	**DHT**	**T/DHT**	**AS**	**DHEA-S**	**17-OH PG**	**PG**
Bazal							
Uyarı sonrası							

ACTH testi sonucu (yapılmış ise) :

Tarih

Yaş

	Kortizol	**17-OH PG**	**AS**	**PG**
0. dk				
30. dk				
60. dk				

<u>GÖRÜNTÜLEME</u>

Abdominal USG:

Pelvik USG:

Skrotum USG:

Adrenal USG:

Pelvik MRI:

<u>GENETİK ANALİZ</u>

Karyotip:

AR gen testi sonucu:

SRD5A2 gen testi sonucu:

NOTLAR.

PSİKOLOJİK-PSİKİYATRİK DEĞERLENDİRME (Cinsiyet seçimi, ailenin özellikleri)

TEDAVİ

Gonadektomi: *Var mı? Zamanı (tarih,yaş), Patoloji sonucu*

Eksternal genital düzeltme ameliyatı : *(tarih, yaş), ameliyat özelliği*

Pubertede ek tedavi *(cins steroidi replasman tedavisi vb)*

Diğer

HASTA VE AİLESİNDEN ALINAN ÖRNEKLER:

Tarih	**İsim Soyadı (akrabalık derecesi)**	**Örnek tipi**	**DNA Ölçümü $OD_{260/280,}$ ng/µl**	**Banka no, (-20°C)**

(EK-4).Çalışmada kullanılan primer dizileri.

DHH(NM_021044) geninin genomik DNA primerleri.

Primer	Bölge	Dizi	Mer	Tm	Ürün (bç)
DHH - F1	**Ekzon 1**	5’-GATGCCTAACTGACAGGAGAGT-3’	22	57.5	549
DHH- R1		5’-CCGTCCTAATTACTCTGTCCA-3’	21	56.8	
DHH - F3	**Ekzon 3**	5’-GTTGGGGCCAGTCAGATTA-3’	19	58.5	934
DHH - R3		5’-CCTAGGACCCGGTATCACCT-3’	20	60.2	

HOXA4(NM_002141)geninin genomik DNA primerleri.

Primer	Bölge	Dizi	Mer	Tm	Ürün (bç)
HOXA4 –F1	**Ekzon 1**	5’- GAGGAGTGGGCACTTGACA -3’	19	59,8	1000
HOXA4- R1		5’- CTAACAGTTTGGCGTCTCGT -3’	20	58,0	
HOXA4-R1SEQ		5’-CCATAGGGGTAGGCGGGT-3’	21	62.1	

HSD17B3 (NM_0001979) geninin genomik DNA primerleri.

Primer	Bölge	Dizi	Mer	Tm	Ürün(bç)
HSD17B3 - F1	**Ekzon 1**	5’-GTCCAGTGACTCCTGGAAGA-3’	20	57.8	353
HSD17B3- R1		5’-GACAGAGCAAGTGTCTGTCTCA -3’	22	58.2	
HSD17B3- F2	**Ekzon 2**	5’-CTGGAGAGCAAAGGGATGA-3’	19	58.9	245
HSD17B3- R2		5’-GTGGATGTCTCAGGACTGTGAT -3’	22	59.0	
HSD17B3-F3	**Ekzon 3**	5’-CAGTATGTGCACAGTCTCAGGA-3’	22	59.0	321
HSD17B3- R3		5’-CTCTGCTTTGTAACCGGGCT-3’	20	61.7	
HSD17B3 –F9	**Ekzon 9**	5’-CAGTGCCCCTTGAAGTCAGA-3’	20	61.4	295
HSD17B3- R9		5’-CTTCCTGTTGACCACACATGA-3’	21	59.6	
HSD17B3 - F10	**Ekzon 10**	5’-GCCACTTGATGTTGGCTAGGT-3’	21	61.4	490
HSD17B3- R10		5’- CCAGCAGCAAGGAAGAGCTA -3’	20	60.8	

MAP3K1 (NM_0059215) geninin genomik DNA primerleri.

Primer	Bölge	Dizi	Mer	Tm	Ürün (bç)
MAP3K1–F1	**Ekzon 1**	5’-CGCAGGAGGCCTTACGCT-3’	18	63.9	829
MAP3K1- R1		5’-CGCCTGTCACATGTCTGCAA-3’	20	64.5	
MAP3K1–F4	**Ekzon 4-5**	5’-GTCTGGATCTCCTGACCTCA-3’	20	57,7	1079
MAP3K1- R4		5’-CATTCTTACAGCAGGTCAGTGT-3’	22	57,0	
MAP3K1–F10	**Ekzon 10**	5’-GAAGTTGTGAAGGATGGTA-3’	19	50.6	615
MAP3K1- R10		5’-GAAACCTTGGACATCATAA-3’	19	50.7	
MAP3K1–F17	**Ekzon 17**	5’-CAGATGTGAATGTGAGTTCA-3’	20	52.6	338
MAP3K1-R17		5’-CCAAAGTACTGGGATTACA-3’	19	50.9	

NR5A1 (NM_004959) geninin genomik DNA primerleri.

Primer	Bölge	Dizi	Mer	Tm	Ürün (bç)
NR5A1-F3	**Ekzon 2-3**	5'-CTCAGACAAACGAATCCCA-3'	19	57.1	790
NR5A1-R3		5'-GGTTCTCTTGCAGCGACT-3'	18	56.5	
NR5A1-F4	**Ekzon 4**	5'-GAATGCCAGGCAAAGGAGACT-3'	21	62.9	898
NR5A1-R4		5'-CTGAAGCCAGTGGGAAGGAT-3'	20	61.6	
NR5A1-F7	**Ekzon 7**	5'-GGAGACCATGTTGCATGGTT-3'	20	60	564
NR5A1-R7		5'-CAAACACACAGTGTCAGAACTCA 3'	23	58,9	

WNT4 (NM_030761) geninin genomik DNA primerleri.

Primer	Bölge	Dizi	Mer	Tm	Ürün (bç)
WNT4 –F1	**Ekzon 1**	5'-CAGGCACACGGAGGCAGA-3'	18	64,8	343
WNT4- R1		5'-GCGAGCGAGCCTCCGGT-3'	17	67,5	

ZFPM2 (NM_012082) geninin genomik DNA primerleri.

Primer	Bölge	Dizi	Mer	Tm	Ürün (bç)
ZFPM2 –F3	**Ekzon 3**	5'- GATTTTCTTTATTGTGAAGCCA-3'	22	56,2	494
ZFPM2- R3		5'- CTTCAAGCAGAGGTAGCACTT -3'	21	56,5	

POR (NM_012082)geninin genomik DNA primerleri.

Primer	Bölge	Dizi	Mer	Tm	Ürün (bç)
POR-F1	**Ekzon 2**	5'-CCAAGACTGTGGCTGTCTT -3'	19	56.3	526
POR-R1		5'-GCT CAA GCA CAA TCT AGC A-3'	19	55.2	
POR-F2	**Ekzon 3**	5'-GAGTGGCACGGGACAAA-3'	17	59.1	374
POR-R2		5'-CAG AGC TGC TTC AGG GCT -3'	18	59.4	
POR-F3	**Ekzon 4**	5'-CCTTTGCCACAGTGGCT-3'	17	58.3	541
POR-R3		5'-CAG TCC TGG GGA AAC GA-3'	17	58.0	
POR-F4	**Ekzon 5ve 6**	5'-CCAGCCTAACACGGGTGA-3'	18	60.7	1189
POR-R4		5'-GAG GCA GGA GAG CCC CT-3'	17	60.5	
POR-F5	**Ekzon 7ve 8**	5'-CCTGATGCTCTGGGTTT-3'	17	54.3	1145
POR-R5		5'-GTA CAA ACT GGG CGA GT-3'	17	51.5	
POR-F6	**Ekzon 9 ve 10**	5'-CAGTTCTTTTAGGGGCCA-3'	18	56.3	1144
POR-R6		5'-CAG CAC CTC ACT CCC TT-3'	17	54.3	
POR-F7	**Ekzon 11 ve 12**	5'-GGACTTCCTGTCTGGTT-3'	17	50.0	789
POR-R7		5'-GAC TGA GTC CAC AGC CT-3'	17	51.1	
POR-F8	**Ekzon 13-14-15-16**	5'-GGGCTGGCTTGTGAGATT -3'	18	58.7	1353
POR-R8		5'-GCC TCC AGA GGC ATG GA-3'	17	60.9	

SOX3 (NM_005634)geninin gerçek-zamanlı PZR çalışması için genomik DNA primerleri.

Primer	Bölge	Dizi	Mer	Tm	Ürün(bç)
SOX3-hrm-F1	**Ekzon 1**	5'-CAT CAC TGC GAA CCT GTC A-3'	19	59.4	232
SOX3-hrm-R1		5'-CTG TGG GCC AGC GAG T-3'	16	59.4	
SOX3-hrm-F2	**Ekzon 1**	5'-CTG AGA TCA GCA AGC GCT T-3'	19	59.4	297
SOX3-hrm-R2		5'-CGT TCA CGT GCG TGT ACG-3'	18	61	
SOX3-hrm-F3	**Ekzon 1**	5'-CGC TCA GAG CTA CAT GAA CGT-3'	21	60.6	269
SOX3-hrm-R3		5'-GCA GGT ACA TGC TGA TCA TGT-3'	21	58.6	
SOX3-hrm-F4	**Ekzon 1**	5'-ATG ATC AGC ATG TAC CTG CCA-3'	21	61.5	148
SOX3-hrm-R4		5'-GTG CTC AGA TGT GGG TCA GC-3'	20	61.9	

CENPJ (NM_018451)geninin gerçek-zamanlı PZR çalışması için genomik DNA primerleri.

Primer	Bölge	Dizi	Mer	Tm	Ürün (bç)
CENPJ- F12	**Ekzon 12**	5'-GGA CAG CAG TTC ACA GGA TA-3'	20	56.2	165
CENPJ- F12		5'-GTC CCT TAT CCA AAT TGC CT-3'	20	58.0	

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 1329 **Tarih : 21.11.2016**
Konu : Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER hk.

Sayın Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

İlgi: Tıbbi Genetik Anabilim Dalının 21/10/2016 gün ve 380079 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Yüksek lisans öğrencisi Agharza AGHAYEV' in yürüteceği 2016/1290 dosya numaralı "Cinsiyet Gelişim Bozuklukları İle İlişkili Genlerin Yeni Nesil Dizileme Tekniği İle Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 11/11/2016 gün ve 19 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**
	AÇIK ADRESİ:	**İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL**
	TELEFON	**0 (212) 414 21 53**
	FAKS	**0 (212) 414 21 53**
	E-POSTA	**itfetikkurul@istanbul.edu.tr.**

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**"Cinsiyet Gelişim Bozuklukları İle İlişkili Genlerin Yeni Nesil Dizileme Tekniği İle Araştırılması"**			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	**---**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	**Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	**Tıbbi Genetik**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	**İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**			
	DESTEKLEYİCİ	**İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri**			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	**---**			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz :			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ■	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ■	ULUSLAR ARASI ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**"Cinsiyet Gelişim Bozuklukları İle İlişkili Genlerin Yeni Nesil Dizileme Tekniği İle Araştırılması"**

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	04/11/2016		Türkçe ■ İngilizce ☐ Diğer☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	■		Türkçe ■ İngilizce ☐ Diğer☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐

	Belge Adı	☐	Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	■	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	■	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:19**	**Tarih: 11/11/2016**
	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında görevli **Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER** 'ın sorumluluğunda ve Yüksek lisans öğrencisi Agharza AGHAYEV' in' in yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	**19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik**
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	**Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN**

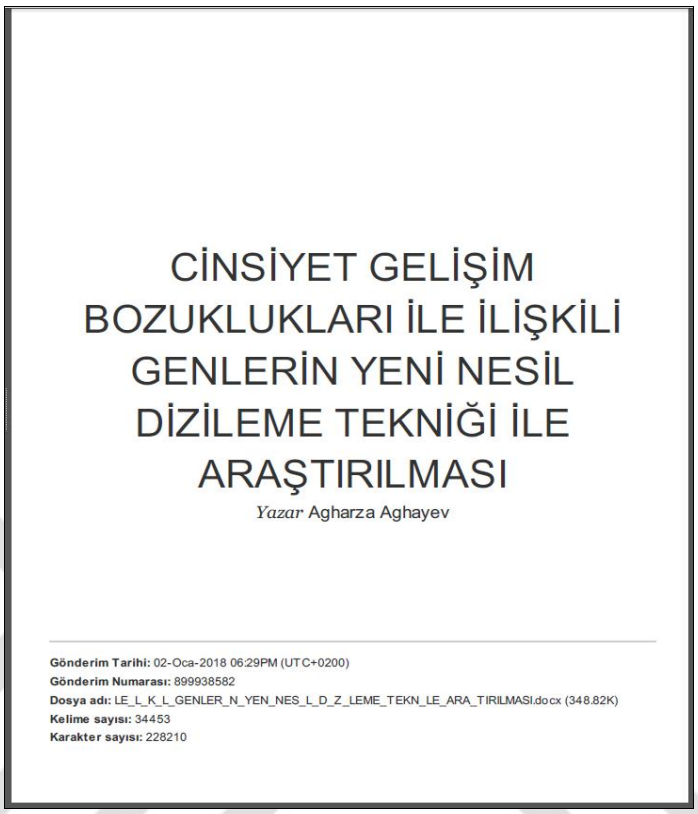
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ☐	H ■	İZİNLİ
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ■	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ☐	H ■	İZİNLİ
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Dr. Sevda ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ■	E ☐	H ■	E ■	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

PATENT HAKKI İZNİ

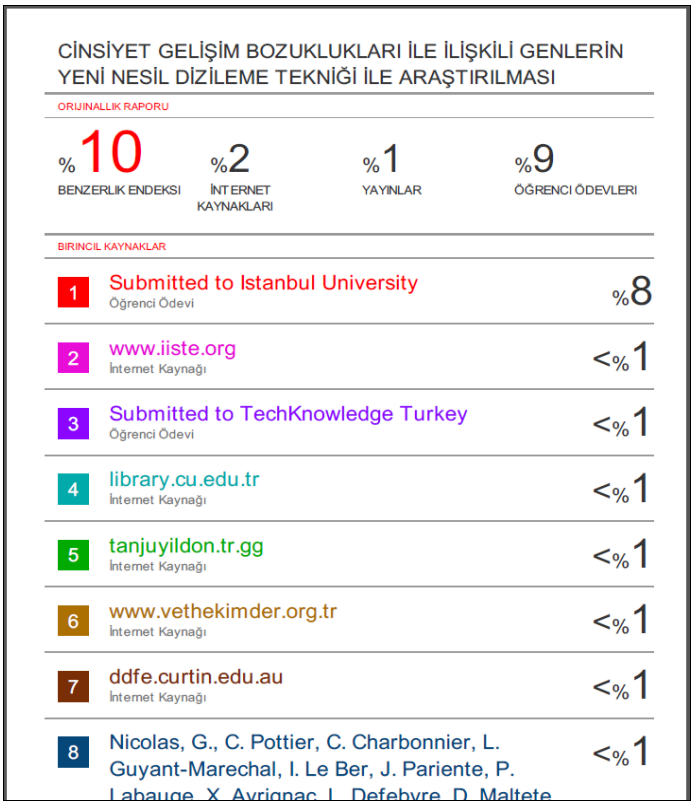
İNTİHAL RAPORU



CİNSİYET GELİŞİM BOZUKLUKLARI İLE İLİŞKİLİ GENLERİN YENİ NESİL DİZİLEME TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI

Yazar Agharza Aghayev

Gönderim Tarihi: 02-Oca-2018 06:29PM (UTC+0200)
Gönderim Numarası: 899938582
Dosya adı: LE_L_K_L_GENLER_N_YEN_NES_L_D_Z_LEME_TEKN_LE_ARA_TIRILMASI.docx (348.82K)
Kelime sayısı: 34453
Karakter sayısı: 228210



CİNSİYET GELİŞİM BOZUKLUKLARI İLE İLİŞKİLİ GENLERİN YENİ NESİL DİZİLEME TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%10	%2	%1	%9
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%8
2	www.iiste.org İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
4	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	tanjuyildon.tr.gg İnternet Kaynağı	<%1
6	www.vethekimder.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	ddfe.curtin.edu.au İnternet Kaynağı	<%1
8	Nicolas, G., C. Pottier, C. Charbonnier, L. Guyant-Marechal, I. Le Ber, J. Pariente, P. Labauge, X. Ayrignac, L. Defebvre, D. Maltete	<%1