



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİ OLGULARINDA GENOMİK
KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN ARRAY CGH
YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

HALİME KÜÇÜK

**DANIŞMAN
PROF.DR. SEVİLHAN ARTAN**

2015



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİ OLGULARINDA GENOMİK
KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN ARRAY CGH
YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

HALİME KÜÇÜK

**DANIŞMAN
PROF.DR. SEVİLHAN ARTAN**

KABUL VE ONAY SAYFASI

Halime KÜÇÜK 'ün Doktora Tezi olarak hazırladığı “Prematür Over Yetmezliği Olgularında Genomik Kopya Sayısı Değişikliklerin Array CGH Yöntemi İle Değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek “KABUL” edilmiştir.

Tarih 03.08.2015

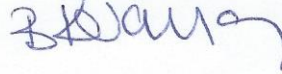
Üye : Prof.Dr. Sevilhan ARTAN (Danışman)



Üye : Prof.Dr. Hikmet HASSA



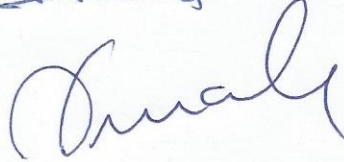
Üye : Doç.Dr. Birsen KARAMAN



Üye : Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR



Üye : Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10./08/2015 tarih ve ..1057./4942. sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof Dr. Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

Özet

Küçük H. Prematür Over Yetmezliği Olgularındaki Genomik Değişikliklerin Array CGH Yöntemi İle Değerlendirilmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doktora Tezi, Eskişehir, 2015.

Prematür over yetmezliği (POY), 40 yaş altı kadınlarda FSH (Follicle Stimulating Hormone) değerlerinin 40 IU/L ve daha üzerinde olduğu, en az 4 ay amenorenin görüldüğü, ovaryan foliküllerin erken azalması ile karakterize, folikül oluşumunu kontrol eden birden fazla genin etkili olduğu, kompleks heterojenik klinik bir hastalıktır. Kadınların %1'inde görülen POY tablosunun etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamış olsa da, literatür verileri güçlü bir genetik bileşeni olduğunu öngörmektedir. POY etiyolojisinin %20'sini ailesel genetik nedenler, %10'unu X kromozom anomalileri oluşturmaktadır. Son yıllarda gelişen teknolojik analiz metotları ile X kromozomunun yanı sıra *AIRE*, *DAZL*, *FOXL2*, *FSHR*, *GALT* ve *TGF-I* gen ailesi üyelerinden *GDF9*, *INHJ* gibi otozomal kromozomlarda lokalize genlerdeki değişikliklerin de POY'da rolü olduğu düşünülmektedir.

Kromozom analizleri 5-6 Mb'dan daha büyük yapısal kromozom anomalilerini ortaya koyabilirken daha küçük kopya sayısı değişimlerini tüm genom genelinde belirlemeyi olanaklı kılan mikroarray yöntemi son yıllarda POY olgularında genetik temelin ortaya konmasında aktif olarak kullanılmaktadır. İnsan genomunun yüksek çözünürlükle taranması ve kopya sayısı değişikliklerinin (CNV) tanımlanması, klinik olarak anlamlı lokusların tespit edilmesine yol açmıştır. Mikroarray yöntemi ile spesifik olarak değerlendirilebilecek anomalilerin saptanması, bu hasta grubuna özgü tanı kitlerinin oluşturulmasına veri sağlayacaktır. Ayrıca olguların ailelerine ve risk altındaki aile bireylerine genetik danışma verilerek bilgilendirilebilmesi ve yönlendirilebilmesi mümkün olacaktır. Bu çalışma, POY etiyolojisinde rol oynayan ve daha önce literatürde tanımlanmış genetik faktörlerin durumunun ortaya konması açısından da bir veri oluşturacaktır. Bu hedefler doğrultusunda POY olgularında yüksek rezolüsyonlu mikroarray analizi ile CNV açısından tüm genom taranarak aday genlerin belirlenmesi, genetik temelin ortaya konması ve takibinde fonksiyonel çalışmaların yapılması amaçlanmıştır.

Çalışmamıza klinik ve genetik değerlendirmeleri yapılan, yaş ortalaması $30,4 \pm 6,36$ olan, sekonder amenoresi bulunan toplam 55 POY olgusu dâhil edilmiştir. Klinik genetik değerlendirme sonrası sendromik olmayan ve normal kromozom kuruluşuna sahip olan olgularda, Frajil X premütasyon değerlendirmesi için *FMR1* geni fragman analizi gerçekleştirilmiştir. Tüm olgularda normal tekrar dizisi saptanmıştır. Çalışmamızın son aşamasında olgu örneklerinde Agilent® 8x60K platformu kullanılarak aCGH analizleri yapılmış, %40 olguda (22/55) 15 farklı CNV tespit edilmiştir. Saptanan CNV'lerin %60'ünün (9/15) delesyon, %27'sinin

(4/15) duplikasyon, %13'ünün (2/15) ise aynı bölgede hem delesyon hem de duplikasyon olduğu gözlenmiştir. Saptanan anomalilerden kromozom 15q26.3 ve kromozom Xp22.33 bölgelerine ait değişiklikler FISH analizleri ile doğrulanmıştır. Çalışmamızda %12,73 oranında değişikliği saptanan *ASMTL*, *P2RY8*, *SHOX* genleri ile değişikliği %1,82 sıklıkla saptanan *MSX1* genleri literatürde de aday genler olarak bildirilmiştir. Ayrıca çalışmamızda oosit ve folikülogenez sürecinde fonksiyon gösterdiği bilinen, değişikliklerinde oogenezin olumsuz etkilenmesi, germ hücrelerinin deplesyonu, ovarian foliküllerin yapısal ve fonksiyonel olarak düzensizlikleri sonucu infertilitenin gözlendiği bildirilen *PCSK6*, *NR4A2*, *NRG1*, *SPIRE2*, *PDPK1*, *KLHL4*, *SIRT1* genlerini içeren lokuslarda değişiklikler gözlenmiştir. Sonuç olarak POY'un etyopatogenezinde rol oynayabileceği bildirilen aday genler çalışmamızda da ortaya konmuş, bunların yanı sıra ileri analizlerin yapılması gereken yeni genler de literatüre kazandırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Prematür Over Yetmezliği, Kopya Sayısı Değişiklikleri, CNV, Mikrodelesyon ve Mikroduplikasyon, array CGH.

Summary

Küçük H. Assessing copy number variations by Array CGH in cases with premature ovarian failure. Eskisehir Osmangazi University Medical Faculty, Department of Medical Genetics Eskisehir, 2015.

Premature Ovarian Failure (POF) is a complex heterogeneous clinical disease that may be affected by the multiple genes that control follicle formation and is characterized by an early loss of the ovarian function. POF occurs in 1% of women and is defined as amenorrhoea for at least 4 months before age 40, with an FSH serum level is than 40 mIU/ml or higher than.

Although the underlying etiology of POF has not been fully understood yet, previous reports predicts that POF is a strong genetic component. In the etiology of POF, the incidences of the involvement of familial genetic causes and X chromosome abnormalities are about 20% and 10%, respectively.

Recently, with developing technology analysis methods and X chromosome along with, alterations of the genes such as *AIRE*, *DAZL*, *FOXL2*, *FSHR*, *GALT* and the members of *TGF-I* gene family comprising *GDF9* and *INHJ* localized on autosomal chromosomes play important roles in POF.

The resolution of conventional cytogenetic analysis is approximately 5-6 Mb and can only detect major chromosome abnormalities. Array comparative genomic hybridization (a-CGH) analysis is able to detect submicroscopic chromosomal rearrangements with a higher genomic resolution. Recent studies have shown usefulness of a-CGH in the detection of whole genome aberrations simultaneously. They have also suggested associations between copy number variations (CNVs) and different common disorders and rare diseases. Thus, exploring the role of CNVs in many traits and diseases becomes essential. High definition scanning of the human genom and the identification of CNVs has led to the identification of clinically significant locus.

Therefore, in the current study, we aimed to reveal the presence and the prevalence of CNVs, using a-CGH analysis on the entire genome, in a cohort of 55 patients with POF. The ages of the patients varies in between 19 to 39 years ($30,4 \pm 6,36$ SD). Following detailed clinical examinations, non-syndromic POF cases with normal karyotypes were included to the study. The DNAs from peripheral blood samples of the cases were extracted and *FMR1* gene premutation analysis was performed by using the Fragile X-PCR technique. No expanded CGG repeats was revealed in the cases. Then we performed a-CGH analysis by using high-resolution Agilent oligonucleotide arrays in a total of 55 POF.

Totally, 15 different CNVs were seen in 40% (22/55) of the cases. Of these CNVs, 60% (9/15) were deletions whereas 27% (4/15) were duplications and 13% were both deletions and duplications of the same region. Most of the a-CGH detected alterations were confirmed by FISH analysis.

The genes including *ASMTL*, *P2RY8*, *SHOX* on chromosome Xp and *MSX1* gene on chromosome 15q have already been reported as candidate genes in the development of POF. The alteration frequencies of these chromosomes in our study were 12% and 1.82%, respectively. Therefore the results of our study are in agreement with the previously reported data.

Moreover, it is known that the genes including *PCSK6*, *NR4A2*, *NRG1*, *SPIRE2*, *PDPK1*, *KLHL4*, and *SIRT1* have functions during oogenesis and folliculogenesis processes. The alterations in these genes causes oogenesis abnormalities, germ cell depletions and infertility because of structural and functional disorders of ovarian follicles. In this study, CNVs in the loci comprising these genes were detected in the samples of some cases. Statistically significant differences were seen when CNVs identified in our study were compared with CNVs reported in phenotypically normal individuals from control populations from the web site Database of Genomic Variants. Determined with microarray method and detection of anomalies will provide data that can be evaluated as the creation of specific diagnostic criteria to this patient group. Also given to the families of patients can be informed and is directed genetic solidarity will be possible in families at risk. This work involved in the etiology of POF and will form a previously defined data in the literature to reveal the situation in terms of genetic factors. Identification of high resolution genome wide microarray analysis in terms CNV candidate genes were screened in accordance with objectives set out in the POF cases of the genetic bases and be made functional in monitoring studies are targeted.

In conclusion, the alterations of the previously reported loci including novel genes involved in etiopathogenesis of POF were also revealed in our study. Besides, new candidate genes that need further analyses in larger cohorts of POF women were detected.

Keywords: Premature Ovarian Failure, Copy Number Variation, CNV, Microdeletion and Microduplication, Array CGH.

İçindekiler

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
Özet	III
Summary	V
İçindekiler	VII
Tablo Dizini	X
Şekil Dizini	XI
Simge ve Kısaltmalar Dizini	XII
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Genel Bakış	3
2.1.1 Folikülogenez	3
2.1.2 POY Kliniği ve Tanısı	6
2.1.3 POY Sonuçları	7
2.2 POY Nedenleri	8
2.2.1 Genetik olmayan nedenler	11
2.2.1.1 Metabolik (hemokromatosiz ve galaktozemi)	11
2.2.1.2 Otoimmün	11
2.2.1.3 İatrojenik	12
2.2.1.4 Virüsler	12
2.2.1.5 Diğer nedenler	12
2.2.2 Genetik nedenler	13
2.2.2.1 Otozomal kromozom yeniden düzenlenmeleri	14
2.2.2.2 Cinsiyet kromozomu anomalileri	14
2.2.2.3 X kromozomu yeniden düzenlenmeleri	15
2.2.2.4 X kromozomuna lokalize POY ile ilişkili genler	20
2.2.2.5 POY ile ilişkili otozomal genler	23
2.3 Genomik Çalışmalar ve POY	29

	Sayfa
2.3.1 GWAS (Genom Wide Association Studies) çalışmaları	29
2.3.2 Kopya sayısı değişimleri	30
2.3.2.1 Kopya sayısı varyantlarının oluş mekanizmaları	32
2.3.3 Array karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH)	34
3 GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1 Hasta Grubu	37
3.2 Gereçler	37
3.2.1 Kullanılan Aletler	37
3.2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	38
3.3 Yöntemler	39
3.3.1 Qiagen® Ekstraksiyon Kiti ile Periferik Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi	39
3.3.2 Genomik DNA'nın Niceliksel ve Niteliksel Analizi	40
3.3.3 GDNA Enzimatik Etiketleme Kiti ile Restriksiyon Kesimi	40
3.3.4 Genomik DNA'nın Floresan İşaretleme	42
3.3.5 Etiketlenmiş gDNA'nın Temizlenmesi	43
3.3.6 Ürün Miktarı ve Spesifik Aktivite Hesaplanması	45
3.3.7 Etiketlenmiş gDNA'nın Hibridizasyona Hazırlanması	45
3.3.8 Mikroarray Hibridizasyonu	45
3.3.9 Hibridizasyon Sonrası Yıkama	46
3.3.10 Mikroarray Taratılması	47
3.3.11 İmaj Dosyalarının Analizi	48
3.3.12 İstatiksel analiz	49
4 BULGULAR	50
4.1 Olguların Klinik Özellikleri	50
4.2 Frajil X Analiz Verileri Tekrar Sayısı Aralıkları	50
4.3 Olgularda Saptanan Kopya Sayısı Değişiklikleri (CNV'ler)	52
4.3.1 Saptanan Anomalilerin Kromozomlara göre Dağılımları	56

	Sayfa
5 TARTIŞMA	61
6 SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR DİZİNİ	75
EKLER DİZİNİ	89
Özgeçmiş	97

Tablo Dizini

	Sayfa	
2.1	POY kliniğinin sınıflandırılması	7
2.2	Primer Over Yetmezliğinin sınıflandırılması	10
2.3	POY hastalarında kromozomal anomalilerin görülme sıklığı	14
2.4	X kromozomu üzerindeki gen bölgeleri ve ilişkili hastalıklar	17
3.1	Mikroarray başına gerekli başlangıç gDNA miktarı	41
3.2	Ana Kesim Karışımının Hazırlanışı	41
3.3	Isı Döngüleyicisi Programı	41
3.4	DNA denatürasyonu ve fragmentasyonu için ısı döngüleyicisi programı	42
3.5	Etiketleme Ana Karışımı Hazırlanışı	43
3.6	DNA Etiketlemesi için ısı döngüleyicisi programı	43
3.7	Beklenen spesifik aktivite ve ürün miktar değerleri	44
3.8	Hibridizasyon Ana Karışımı Hazırlanması	45
3.9	Isı döngüleyicisi programı	45
3.10	Enzimatik etiketleme için kalite kontrol metrik eşik değerleri	48
4.1	Çalışmamıza dâhil olan olguların klinik özeti	50
4.2	aCGH Analiz Sonuçları	53
4.3	Kopya Sayısı Değişikliklerinin Kromozomlara Göre Dağılımı	56
4.4	Kopya Sayısı Değişikliklerinin Genlere Göre Dağılımı	57
4.5	POY çalışma grubuna (n =55) ait istatistiksel önemi olan bölgeler	59
4.6	POY çalışma grubuna (n =55) ait istatistiksel önemi olmayan bölgeler	60

Şekil Dizini

	Sayfa	
2.1	Farklı gelişim evrelerindeki foliküllerin kesit görüntüsü	3
2.2	Folikül dinamiklerinin fizyolojisi	5
2.3	X kromozomu üzerinde POY ile ilişkili CNV'ler	16
2.4	Normal, premutasyonlu ve tam mutasyonlu bireylerde <i>FMR1</i> gen anlatım modelleri	20
2.5	X kromozomu üzerindeki POY ile ilişkili genler	23
2.6	Varyasyonlardaki artış	31
2.7	CNV'lerin boyut dağılımları	31
2.8	Non-allel homolog rekombinasyon	33
2.9	Homolog olmayan serbest uçların bağlanması	33
2.10	FoSTeS	34
2.11	aCGH işlemlerinin genel özeti	35
3.1	Enzimatik Kesim İşleminin Değerlendirilmesi	42
3.2	Mikroarray lamının lam tutucuya yerleştirilmesi ve ozon-bariyer lam kapağının kapatılması işlemi	47
3.3	Feature Extraction 10.5.1.1 Yazılımının Standart Ayarları	48
3.4	Feature Extraction 10.5.1.1 yazılımının verdiği CGH Kalite Kontrol Raporu Örneği	49
4.1	<i>FMR1</i> geninde tekrar sayısı 28 homozigot olan, 29 numaralı olguya ait fragman analizi görüntüsü.	51
4.2	<i>FMR1</i> geninde tekrar sayısı 28 ve 29 heterozigot olan, 31 numaralı olguya ait fragman analizi görüntüsü.	51
4.3	Xp22.33 bölgesi duplikasyonu	54
4.4	15q26.3 bölgesi delesyonu	54
4.5	2q23.3-q24.1 bölgesi delesyonu	55
4.6	xq21.2-q21.31 bölgesi delesyonu	55
4.7	Kopya sayısı değişikliklerinin kromozomlara göre dağılımı	57
4.8	Beş olguda gözlenen (9,15,30,32,44) 15q26.3 bölgesi delesyonu FISH görüntüsü	58
4.9	İnterfaz hücreleri	58

Simge ve Kısaltmalar Dizini

aCGH	Array Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
CNV	Kopya sayısı değişiklikleri
POY	Prematür over yetmezliği
FSH	Folikül Uyarıcı hormon
AMH	Anti-Mullerian hormon
BMP	Kemik morfogenetik protein
PGC	Primordial germ hücreleri
LH	Luteinizing hormone
AFC	Antral folikül sayımı
HMG	İnsan menopozal gonadotropin
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
MHC	Büyük doku uygunluk kompleksi
POF	Prematür ovaryan yetmezlik
CMV	Cytomegalovirus
SHBG	Seks hormon bağlayıcı globülin
HIV	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
GWAS	Genom ilişkilendirme çalışmaları
FISH	Floresan İn Situ Hibridizasyon
<i>FMR1</i>	Frajil X Mental Retardasyon 1
ADD/ADHD	Dikkat eksikliği sendromu
FXS	Frajil X sendromu
FXPOI	Frajil X primer over yetmezliği
FXTAS	Frajil X tremor ataksi sendromu
FMRP	Frajil X Mental Retardasyon protein
PGD	Preimplantasyon genetik tanı
IVM	In vitro maturasyonu
gDNA	genomik DNA
TNF- α	Tümör nekroz faktörü- α
CMV	Sitomegalovirüs

APS	Otopoliglandüler -Sendrom
HRT	Hormon replasman tedavisi
IVM	İn vitro oosit maturasyonu
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Prematür ovaryan yetmezlik (POY), 40 yaş altı kadınlarda FSH değerlerinin 40 IU/L ve daha üzerinde olduğu, en az 4 ay amenorenin görüldüğü, ovaryan foliküllerin erken azalması ile karakterize, folikül oluşumunu kontrol eden birden fazla genin etkili olduğu düşünülen kompleks bir hastalıktır. POY'un bu değişken kliniğinden dolayı, doğrudan overden kaynaklanan fonksiyon bozukluğu anlamında "Primary ovarian insufficiency" terimi "prematür over yetmezliği" ya da "prematür menopoz" terimlerine alternatif olarak sunulmuştur (Welt, 2008).

POY ilk kez Coulam ve arkadaşları tarafından 1930 yılında, adet gecikmesi ve üriner gonadotropin seviyelerinde meydana gelen artış olarak tanımlanmıştır (Coulam, Adamson, & Annegers, 1986). Bu durum ovaryumda primordiyal folikül yokluğu ve kalıcı infertilite olarak tanımlanmaktaydı (Goldenberg, Grodin, Rodbard, & Ross, 1973). Ancak daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda POY tanısı konulan olguların ortalama %50'sinde over fonksiyonu devam etmekle birlikte tanı aldıktan sonra, %5-10 olguda gebelik tanımlanmıştır (Rebar & Connolly, 1990). Günümüzde adet düzensizliği belirtileri ile başlayan POY vakaların tanımlanmasında estradiol (E2), FSH, Anti-Müllerian hormon (AMH) veya inhibin B biyokimyasal markerları kullanılmaktadır. POY'un klinik tanısı 40 yaşından küçük bayanlarda, 4 aydan uzun süren amenore ve en az bir ay ara ile iki sefer 40mIU/ml'den fazla saptanan serum FSH seviyesi ile konulmaktadır (Santoro, 2003; Vegetti vd., 2000).

İnsidansı yaşla birlikte artmaktadır; 20, 30 ve 40 yaş için insidansı sırasıyla %0,01, %0,1 ve %1'dir (Kodaman, 2010). POY, hiç adet görmeme şeklinde (primer amenore) ya da ergenlik sonrası adet gördükten sonra da ortaya çıkabilmektedir (sekonder amenore). Primer amenoresi olan kadınlarda POY prevalansı %10-28, sekonder amenoresi olanlarda ise %4-18 arasındadır (O'Herlihy, Pepperell, & Evans, 1980). Ancak POY'lu kadınların %90'ında sekonder amenore mevcut iken sadece %10'unda primer amenore gözlenmektedir (Günyeli, 2009). Foliküler atrezi ile overlerde folikül oranının azalması sonucu kalan foliküller, hipofizer FSH üzerine negatif feedback oluşturmak için gerekli inhibin ve östrojen üretememektedirler. Bu nedenle ilerleyen yaşla beraber folikül azalması, sekonder amenore olgularında POY ve yaş arasındaki ilişkiyi foliküler atrezi olarak açıklamaktadır.

POY, genç kadınlarda kabullenilmesi güç olan bir durumdur. Fiziksel ve ruhsal sağlık, cinsel hayat, üreme kapasitesi ve sosyal yaşam etkilenmektedir. Kardiyovasküler hastalık, felç, osteoporoz için bu kadınlar kendi yaş grubundaki kontrollere göre daha fazla risk taşımaktadırlar. Menopoz etkilerinin erken ortaya çıkması ve beklenen yaşam süresinin uzaması ile bu dönemde geçirilen yaşam süresinin doğal menopoz süresine göre daha uzun olmasına neden olmaktadır. Erken dönemde tanı

konulması, tedavi sürecinin planlamasına, erken dönemde çocuk sahibi olma ve diğer üreme ile ilgili seçeneklere olanak sağlayacaktır. POY hasta grubuna özgü tanı kitlerinin oluşturulması hem olguların hem de ailelerinin genetik yönden bilgilendirilmesi ve yönlendirilmesi açısından önemlidir.

POY etiolojisinde %20 ailesel genetik nedenler, %10 X kromozomu anomalileri olduğu bildirilmiştir (Bennett, Conway, Macpherson, Jacobs, & Murray, 2010). Kromozom X üzerindeki Xq13.3-q21.1 (POF2) ve Xq21.3-q27 (POF1) bölgelerinin overin işlevi açısından önemli olduğu bildirilmiştir. (Dudding vd., 2010; Simpson, 2008). Ancak POY etiolojisinde rol oynayan genetik ve/veya epigenetik etkenler henüz ortaya konulamamıştır. Teknolojik ilerlemelere bağlı olarak sık gözlenen hastalıkların genetik temelini ortaya konma çalışmaları içerisinde POY genetiğine ilişkin çalışmalar da yoğunlaşmıştır.

Bugün, Frajil X premütasyon taşıyıcıları ile POY gelişimi arasında bağlantı olduğu bilinmektedir. X kromozomu q27.3 bölgesinde yer alan *FMR1* genindeki CGG üçlü tekrar dizilerinin sayısı 55-200 arasında olduğu zaman Frajil X premütasyonu ortaya çıkmaktadır. Genel toplumda premütasyon oranı erkekte %0,125, kadında %0,4 (Wilkins-Haug, 2014) iken POY olgularında sıklık yaklaşık on kat artmaktadır. Premütasyon taşıyıcısı olan kadınların genel olarak %20 kadarında POY gelişmektedir. Normal popülasyonda 29-30 civarında olan CGG tekrar sayısı 45'lere ulaştığında over yetmezliği başlamaktadır. Genel idiyopatik POY tanısı alan vakaların %3'ü premütasyon taşıırken, bu oran ailesel vakalarda %12 dolaylarına ulaşmaktadır (Marozzi vd., 2000; Shelling, 2000). Bir çalışmada Türk popülasyonuna ait olarak Frajil-X premütasyon taşıyıcılığı oranı %6,6 olarak bildirilmiştir (Tural vd., 2014).

Kromozom analizleri rezolusyonu 5-6 Mb'dan daha büyük olan yapısal kromozom anomalilerini ortaya koyabilirken mikroarray yöntemi daha küçük kopya sayısı değişimlerini tüm genom genelinde belirlemeyi olanaklı kılmaktadır. İnsan genomunun yüksek çözünürlükle taranması ve kopya sayısı değişikliklerinin (CNV) tanımlanması, klinik olarak anlamlı lokusların tespit edilmesine yol açmıştır (Can, Fang, Xin, Yi-min, & Dong-zhi, 2011; Gleicher, Weghofer, Oktay, & Barad, 2009). Özellikle geçtiğimiz beş yıllık süreç içerisinde mikroarray yaklaşımı POY olgularında genetik temelin ortaya konması çalışmalarında sık kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, sendromik olmayan POY olgularında yüksek rezolusyonlu a-CGH tekniği aracılığıyla tüm genom CNV'lerin belirlenerek CNV bölgelerinde lokalize POY etyopatogenezinde rol oynayabilecek aday genlerin belirlenmesi, takip edecek fonksiyonel çalışmalara bir temel oluşturulması amaçlanmıştır.

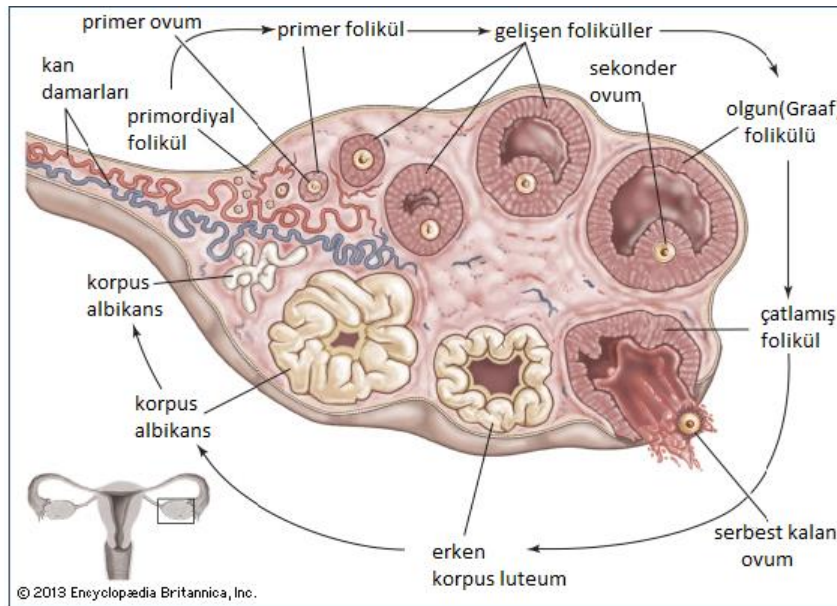
2- GENEL BİLGİLER

2.1 –Genel Bakış

POY (OMIM 311360) birden fazla genin etkili olduğu düşünülen kompleks, heterojenik, klinik bir hastalıktır. Menopozdan farklı olarak 40 yaşın altındaki %1-3 üreme çağındaki kadınlarda görülen yumurtalık fonksiyon bozukluğudur. Olguların %80-90'ında neden bilinmemektedir ve idiyoPATİK POY olarak adlandırılır. Hayvan çalışmalarında tanımlanan oosit spesifik genlerdeki defektlerin oosit gelişiminde ve ovaryan fonksiyonlarda bozulmalara neden olduğu gözlenmiştir. POY etiolojisinin yaklaşık %20'sinden ailesel genetik nedenler, %10'undan X kromozom anomalileri sorumludur. Fragile X mental retardation (*FMR1*) premutasyonu POY olgularında %6-13 sıklığında gözlenmektedir (Marozzi vd., 2000; Shelling, 2000)

2.1.1 Folikülogenez

Folikül, overlerin ana fonksiyonel ünitesidir ve en önemli görevi oositi taşımasıdır. Morfolojik olarak primordiyal folikülün primer, preantral ve antral faz aşamalarından geçerek graaf ya da preovulatuvar folikül fazına ulaşması süreci folikülogenezis olarak adlandırılır (Şekil 2.1). Yani olgunlaşmamış oosit içeren somatik hücrelerin yoğun bir şekilde paketlenmesi ve menstrual sıklusa girecek olan primordiyal germ hücresinin ovulasyon öncesi foliküle olgunlaşması sürecidir (MANDL & Zuckerman, 1951; Zuckerman & Baker, 1977).



Şekil 2.1: Farklı gelişim evrelerindeki foliküllerin kesit görüntüsü (Britannica, 2013)

Overler, oositin üretimi ile endokrin; östrojen ve progesteronun üretimi ile de ekzokrin fonksiyon gösteren organlardır.

Erkek ve dişi gametlerin geliştiği hücre dizisine "germ line" adı verilir. Bu hücreler ilk olarak gelişimin 4. haftasında ayırt edilebilir ki bu hücelere primordial germ hücreleri (PGH) adı verilir. Olgunlaşmamış oositleri içererek oluşan bu foliküller oositi atreziden korurlar. Primordial germ hücreleri (PGC), ektodermal kökenli kemik morfogenetik proteinler (BMP4, BMP8b) ve endodermal kökenli BMP2 sinyali ile oluşurlar. Oosit genomu aktive olur ve gen transkripsiyonu başlar. Transmembran proteini Fragilis'in germ hücresi üzerinde ekspres olması ile germ hücre oluşumu başlar. Fragilis, sadece germ hücrelerinde bulunan *DPPA3* (Developmental Pluripotency-Associated Protein 3) geninin ekspresyonunu uyarır ve pluripotent yapının devamını sağlar. PGC overe ulaşınca ovogona adını alır ve ovogonalar sinsiyem oluşturarak mayozu başlama sinyalini diğer ovogonalar ulaştırırlar. Sekizinci haftadan itibaren, hayvan çalışmalarında DNA reorganizasyonundan, mayoz bölünmede kromozomların kısalıp kalınlaşmasından, sinaps, kohezini ve rekombinasyondan sorumlu olduğu düşünülen *STRA8* (Stimulated By Retinoic Acid 8) geninin etkisiyle Pre-mayotik DNA sentezlenmesi ve primer oositler oluşumu gerçekleştiği bildirilmiştir (Baltus vd., 2006).

Dişilerde primordiyal germ hücreleri intrauterin folikülogenez sırasında büyürler ve doğuma kadar birinci mayozun profaz evresinin diploten safhasında kalırlar.

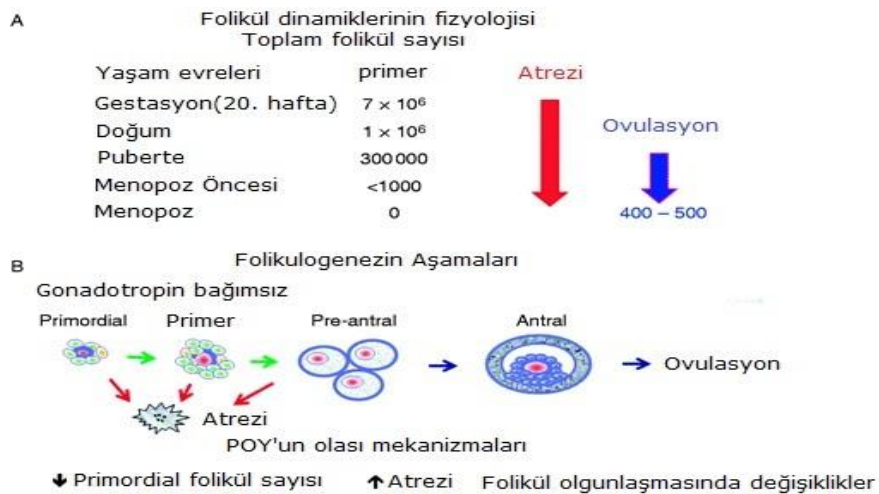
Oositler salgıladıkları sinyaller ile folikül oluşumunu ve granüloza hücre çoğalmasını, granüloza hücreleri de oosit büyümesini ve mayozunu düzenlerler. Over rezervinin belirteci olan primordial foliküller, overdeki farklı bölümlerden kaynaklanan (oosit, granuloza ve teka hücreleri, stroma) sinyallerin otokrin-parakrin etkileşimleri ile primer foliküllere farklılaşmaktadırlar (Oktay, Karlıkaya, Akman, Ojakian, & Oktay, 2000). Folikül olgunlaşmasında intra-ovaryan faktörlerin önemi tam olarak aydınlatılamamış olsa da FSH ve LH hormonlarının bu süreçte önemli rol oynadıkları bilinmektedir.

Olgunlaşmamış oositleri içeren primordiyal foliküller oosit ile bazal laminayı birbirinden ayıran yassı granül hücreleriyle çevrili bir tabakadan oluşur. Bu hücrelerin kübik yapıya değişimi primer folikül oluşumunun bir göstergesidir. Primordiyal folikül 290 gün sonra ya da düzenli devam eden 10 siklus sonra sekonder foliküle dönüşür. Bu aşamada mitotik aktivitesi yüksek olan folikülün etrafında ikinci bir tabaka oluşumunun hemen ardından çok tabakalı granül hücreleri oluşur. Süreç sürekli devam eder, yani yumurtalık herhangi bir zamanda gelişimin tüm evrelerine ait folikülleri içerir ve olgun bir oosit, ovulasyon öncesi folikülden ayrıldığında sona erer. Oositin yanında sıvı dolu bir girinti şeklindeki antrumun ortaya çıkmasının ardından graaf (antral) folikül olarak da adlandırılan tersiyer folikül oluşur. Dominant folikül olan folikül 20 mm çapına ulaşarak

preovulatör folikülü oluşturur. On üçüncü menstrual siklus foliküler fazının ardından, kumulus hücrelerin tüm içeriğinin oositle birlikte boşaltılması ile ovulasyon gerçekleşir ve fallop tüpleriyle uterusu taşınır. Oosit fertilizasyona gidebilecek özelliktedir. Fertilizasyon gerçekleşmez ise oosit menstrual sıklusa katılır ve parçalanmış folikül, korpus luteum şeklinde değişime uğrar ve folikülogenez süreci tamamlanır.

Ovulatuvar siklusların düzenin sağlanması, hipotalamus, hipofiz ve overden gelen uyarıcı ve inhibe edici sinyallerin dengesi ile gerçekleştirilir. Bu dengenin sağlanması için hipotalamo-hipofiz-ovaryen aksın eş zamanlı çalışması gereklidir. Gonadotropin-releasing hormon (GnRH) medial bazal hipotalamus bölgesinden pulsatile salınarak hipofiz portal sisteme gönderilir. Böylece GnRH ön hipofiz bezinden FSH ve LH (luteinizing hormone) hormonlarının sistemik dolaşıma salınmasını sağlar. LH'nin keskin bir şekilde artışı ile oositler birinci mayoz bölünmelerini tamamlarlar ve metafaz II'de kalırlar. LH'nin bu ani yükselmesiyle ovulasyonla oosit atılır ve folikül gelişimi tamamlanır (Piette, De Mouzon, Bachelot, & Spira, 1990).

Germ hücrelerinin sayısı başlangıçta yüzlerle, mid-gestasyonda milyonlarla ifade edilirken menopozda atrezi sonucu rezerv tükenir. Milyonlarca üretilen bu hücrelerden 300-400 tanesi ovulasyon aşamasına kadar gelebilmektedir. Fetal yaşamda, germ hücreleri gebeliğin dördüncü ayında mitoz ile çoğalarak yaklaşık 6-7 milyon oogoniaya ulaşır. Bu noktadan itibaren primordial folikül havuzunda apoptoz, gen regülasyonu ile atrezi başlar. Ortalama olarak bu germ hücrelerinin sayısı doğumda 1-2 milyon, puberte başlangıcında ise 300-400 bine kadar düşmektedir. Üreme hayatı boyunca, atrezi ve ovulasyon kombinasyonu yoluyla, yaklaşık olarak her ayda 1000 folikül tükenmektedir (Persani, Rossetti, & Cacciatore, 2010). Yaklaşık 38 yaşında bu azalma aniden hızlanmaktadır, menopozda ise folikül kalmamaktadır (S. M. Nelson, Messow, Wallace, Fleming, & McConnachie, 2011). (Şekil 2.2)



Şekil 2.2:Folikül dinamiklerinin fizyolojisi (Persani vd., 2010).

2.1.2 POY Kliniği ve Tanısı

Normal yaşında ve puberte deneyimi olup, dzenli adet kanamaları olan pek çok kadın POY durumu ile karşılaşabilmektedir. Tanımlanan olguların %10-28'inde primer amenore öyküsü bulunurken POY prevelansı sekonder amenoresi olanlarda %4-18 arasında bulunmaktadır. Kadınlarda POY'a doğru gidişe işaret eden erken ve özgül uyarıcı belirtiler bugüne kadar tanımlanmamıştır. Ancak olguların %25'inde gebelik ve doğumla ya da oral kontraseptif hapların bırakılması ile akut ortaya çıkan amenore oluşurken; %50'sinde ise, oligoamenore ya da disfonksiyonel uterin kanama şeklinde adet dzensizliklerinin görüldüğü "prodromal POY" olarak da adlandırılan bir dönem vardır. Yaygın olmamakla beraber gece terlemesi ve ateş basması semptomları bazı olgularda görülebilmektedir (Anasti, Kimzey, Defensor, White, & Nelson, 1994).

POY tanısının konulması için, 40 yaşın altında, en az 4 ay adet dzensizliği (oligomenore, amenore, polimenore, menoraji) olan kadınlarda ve yine en az bir ay ara ile ölçülen iki FSH değerinin menopozal düzeyde (FSH > 40 mIU/L) olması gerekmektedir.

Over fonksiyonları, olguların %50'sinde aralıklı olarak devam ettiğinden bazı kaynaklar tanı için, 4 ay amenoreik dönem gerekli görse de, pratikte bu süreyi beklemek yerine, olgularda son 4 aydır adet dzensizliği olması yeterli görülmektedir. Menopoz öncesi, inhibin ve östrojenin negatif geribildirimi ile FSH düzeyleri ovulasyondan sonra düşer. Ancak menopoza ulaşıldığında bu negatif geribildirim olmadığı için FSH sürekli serbest bırakılır. 40 IU/L den fazla FSH düzeyleri genellikle post menopozal aralığında kabul edilir. POY tanısı için kullanılan diğer belirteçler; yüksek LH, düşük İnhibin B, AMH, testosteron düzeyleri ve değişken östradiol seviyeleridir. Serum LH düzeyi düşük, üriner E düzeyi yüksek olan olgularda spontan ovulasyon oranı artmıştır (Fritz & Speroff, 2011).

Son yıllarda serum AMH düzeyi, ovaryan yaşlanma ve ovaryan folikül varlığının göstergesi olarak duyarlılığı yüksek bir marker olarak gösterilmektedir. AMH, doğumla birlikte serumda gösterilebilen, puberteye kadar artış gösterip, ovaryan yaşlanmayla birlikte progresif olarak azalan bir belirteçtir. AMH, yaşla negatif korelasyon gösterirken, antral folikül sayımı (AFC) ile pozitif korelasyon gösterir. FSH değeri yüksek genç hastalarda, folikül havuzundaki boşalmayı İnhibin B ve antral folikül sayısına oranla çok daha duyarlı yansıtmaktadır (Gleicher, Weghofer, & Barad, 2011).

Lawrence M.Nelson ve arkadaşları tarafından POY kliniğinin sınıflandırılması aşağıdaki gibi güncellenmiştir:

- Gizli (okült) primer over yetersizliği: Normal sınırlarda bazal serum FSH düzeyi ve infertilitenin eşlik ettiği over yetersizliğidir.

- Biyokimyasal primer over yetersizliği: yüksek sınırlarda bazal serum FSH düzeyi ve infertilitenin eşlik ettiği over yetersizliğidir.

- Aşikâr primer over yetersizliği: Yüksek sınırlarda bazal serum FSH düzeyleri ile oligomenore, polimenore veya adet siklus düzensizliklerinin eşlik ettiği over yetersizliğidir.

Prematüre over yetmezliği: Primordial folikül tükenmesi olarak ifade edilen infertilite ve menopozal gonadotropin seviyeleri ile karakterize over yetersizliğidir (Tablo 2.1) (ME & Derneği, 2014).

Tablo 2.1: POY kliniğinin sınıflandırılması (L. M. Nelson, 2009)

Ovaryan Klinik Durum	Menstruasyon	Gonadotropin	Fertilite
Okült yetersizlik	Normal	Normal	Azalmış
Biyokimyasal yetersizlik	Anormal	Artmış	Azalmış
Aşikâr yetersizlik	Anormal	Artmış	Azalmış
Prematür ovaryan yetmezlik	Yok	Artmış	Yok

POY'da zamanla azalan over rezervinin araştırılmasında kullanılan belirteçler:

- FSH, AMH, inhibin A-B düzeyleri
- Dinamik testler: Dış uyaran yanıtının değerlendirilmesine özgü klomifen sitrat testi, ekzojen FSH over rezerv testi, GnRH agonist ve HMG uyarı testleri.

- Biyofiziksel belirteçler: Over volümü ve over folikül yoğunluğunun araştırılması, antral folikül sayımı, USG eşliğinde over stromal kan akımının değerlendirilmesi yöntemleri kullanılmaktadır.

2.1.3 POY Sonuçları

POY ile ilişkili ana sonuç infertilitedir ve kabullenilmesi oldukça zor bir durumdur. Tanı alan kadınlarda yardımcı üreme teknikleri ve donör yumurta, evlat edinme gibi aile planlaması seçenekleri arasındadır. Ancak tanıyı takiben %5-10 olguda gebelik tanımlanmıştır. Bu durum POY'da over rezervinin azaldığını ancak tamamen bitmediğini göstermektedir. Olguların ortalama %50'sinde over fonksiyonu devam etmektedir.

POY tanısı olan kadınlarda kalp hastalığı, osteoporoz, hipotiroidi ve adrenal yetmezlik gibi otoimmün hastalıkların gelişme riski artmıştır. POY

olgularında bu hastalıklarla ilgili mortalite oranı, doğal menopoz yaşayan kadınlara göre %50 daha yüksek bulunmuştur (Jacobsen, Knutsen, & Fraser, 1999).

POY'da overlerdeki inaktivasyon kaynaklı hormon üretiminin yetersiz olması nedeniyle uzun süreli östrojen eksikliği ostoporoz ile beraberinde menopoz etkilerinin erken ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Östrojen, kemik oluşumu ve sağlığının devamı için önemlidir. Kemik yoğunluğunun POY'da kontrollere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (Maclaran, Horner, & Panay, 2010).

Düşük östrojen düzeyleri, trigliserid düzeylerindeki artış, HDL (High-density lipoprotein) ve insülin duyarlılığında azalma ile birlikte kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörleri ile ilişkili bulunmuştur. İskemik kalp hastalığı sebepli mortalite oranı 40 yaşından önce POY tanısı alan kadınlarda, normal menopoz yaşayan kadınlara göre %80 fazla bulunmuştur (De Vos, Devroey, & Fauser, 2010).

POY olgularında utangaçlık, benlik saygısı ve sosyal anksiyete gibi psikolojik sorunlar ile bilişsel işlev ve bellek sorunlarının görülme riski artmaktadır (Schmidt vd., 2006).

POY olan kadınların en az %20'si, hipotiroidizm, şeker hastalıkları, sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit, Addison hastalığı ile sınırlı olmamakla beraber otoimmün hastalıklara sahiptir. Adrenal otoimmün sorunlardan dolayı, adrenal yetmezlik ve Addison hastalığı gelişme riski %50 olup, tanıda geç kalındığı takdirde ölümcül olabilmektedir (L. M. Nelson, 2009).

2.2-POY Nedenleri

Over rezervindeki erken dönemde bozulmalara neden olan mekanizmalar üç başlık altında incelenebilir.

1-) Doğum öncesi mayoz ve oogoniyaların çoğalmasını, germ hücre göçünü düzenleyen mekanizmalardaki değişiklikler nedeni ile primordial foliküllerin azalması;

a.Germ hücrelerinde, genetik olarak aktif iki adet X kromozomunun olmaması, genetik olarak aktif Y kromozomunun olması,

b.PGC'nin ürogenital migrasyonunun yokluğu,

c.PGC'nin ürogenital migrasyonunun normalden daha az olması,

d.PGC'nin mitoz bölünme kusurları

e.Germ hücrenin uterus içinde hasar görmesi

f.Granulosa hücre tabakasının gelişimindeki kusurlar

g.Mayoz bölünmenin profaz evresinde durması aşamasından sonra oogonyum fazından primer folikül basamağına geçememe

h.Primer foliküllerde fetal FSH'a yanıt.

2-) Foliküler atrezi hızını düzenleyen faktörlerdeki bozukluklar sonucu atrezinin hızlanması (örneğin, gonadotropinler, östrojenler, androjenler, büyüme faktörleri, sitokinler, aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, nitrik oksit, TNF- α (tümör nekroz faktörü-a), Fas ligandı ve periferik aktive T hücreleri);

3-) Foliküllerin işlevi veya olgunlaşmasındaki bozukluklar

Folikül işlevi ve olgunlaşmasının aktivasyonunda rol alan mekanizmalar oldukça heterojendir. POY olgularının yaklaşık %25'i iatrojeniktir. POY, cerrahi sonrası ve kanser tedavileri (radyoterapi ve kemoterapi) ile ilişkili olabilmektedir. Sigara içme, ağır metaller, çözücüler, böcek ilaçları, plastik, endüstriyel kimyasallar gibi çevresel faktörlerle indüklenebileceği öne sürülmüştür. Ayrıca, POY enfeksiyonlara (kabakulak, zona, sitomegalovirüs), otoimmün hastalıklara (yani, sistemik lupus eritematozus, Hashimoto tiroiditi, Addison hastalığı, romatoid artrit, otoimmün poli endokrinopati-kandidiyaz-ektodermal distrofi) ve metabolik hastalıklara (galaktozemi) sekonder olarak gelişebilmektedir.

Turner Sendromu, karbonhidrattan yoksun glikoprotein sendromu, psödohipoparatiroidizm tip 1a, Progresif eksternal oftalmopleji, otoimmün poliglandular sendrom tip 1 ve ovaryan lökodistrofi gibi bazı sendromlarda POY tablosu görülmektedir (Persani vd., 2010). POY etiyolojisinin %50'den fazlası iatrojenik veya muhtemelen genetikdir. POY'a neden olan genetik mekanizmalar farklı olabilir. Bugüne kadar, olguların %10'dan fazlası herhangi bir gen mutasyonu ile ilişkilendirilememiş ve az sayıda gende mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu nedenle, POY genetik yönüyle, muhtemelen pek çok farklı lokusları içeren karmaşık bir multi faktöriyel bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Kokcu, 2010). POY'un nedenleri ve tanıya yönelik yaklaşımlar genel olarak tablo 2.2'de sınıflandırılmıştır.

Tablo2.2: Primer Over Yetmezliğin sınıflandırılması (Jin, Yu, & Huang, 2012)

POY'un nedenlerine göre sınıflandırılması		
Etyoloji	Bilinen risk faktörleri	Tanı amaçlı yöntemler
Genetik	Kromozomal anomaliler (Monozomi X, Trizomi X, X kromozom mosaisizm, delesyonlar ve dengeli X/otozomal translokasyonlar)	FISH veya klasik karyotipleme
	X kromozomu üzerindeki POY ile ilişkili genlerde mutasyon	<i>FMR1</i> , <i>BMP15</i> genetik görüntülenmesi
	Otozomal kromozomlar üzerindeki POY ile ilişkili genlerde mutasyon klasik galaktozemi	<i>GDF-9</i> , <i>FOXL2</i> , <i>FSHR</i> , <i>LHR</i> , <i>FSH-β</i> , <i>LH-β</i> , <i>INHA</i> , <i>GALT</i> , <i>AIRE</i> genlerinin genetik görüntülenmesi
Metabolik	Klasik galaktozemi	Aile öyküsü, belirtiler, enzim düzeyleri için kan, idrar, amniyosentez testleri, <i>GALT</i> geninin mutasyon analizi
	17-OH eksikliği	Belirtiler, serum gonadal ve adrenal cinsiyet hormon düzeyleri, 17-OH-hidroksilaz'ın genetik görüntülenmesi,
Otoimmün	APS eşliğinde kuru göz sendromu, myastenia gravis, romatoid artrit, SLE	Serum ovaryan antibadiler ve adrenal korteks antikorlar 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) antikorlar FSH ve LH reseptörleri, anti-tiroid antibadiler, anti-paratiroid antibadiler, <i>AIRE</i> geninin genetik görüntülenmesi
Iatrojenik	Kemoterapi	Yüksek risk: alkilleyici ajanlar Düşük risk: vinca alkaloidleri, anthracyclik antibiyotikler ve antimetabolitler (yaş ve doza bağımlı)
	Radyoterapi	Yaş ve doza bağımlı
	Cerrahi girişimler	Pelvik cerrahi
Virüsler	Kabakulak, HIV enfeksiyonları	Enfeksiyon ile ilgili belirtiler, antikorlar
Çevresel/yaşam tarzı	Sigara içme, toksinler, yaşam boyu düzensiz adet periyotları, nulliparity	
Mevcut somatik hastalıklar	Epilepsi vb.	

FISH, fluorescence *in situ* hybridization; APS, autoimmun polyglandular syndrome; SLE, systemic lupus erythematosus; VCD, 4-vinylcyclohexene diepoxide.

2.2.1 Genetik olmayan nedenler

2.2.1.1 Metabolik (hemokromatosiz ve galaktozemi)

Metabolik nedenlere bağlı olarak oluşan POY, genellikle primer hastalığın gonadlara direkt etkilerinden dolayı ortaya çıkmaktadır. Talasemi majörde kan transfüzyonları nedeniyle demir birikimi veya hemokromatosiz oluşur. Demir birikiminin hipofizer yetersizliğe neden olması ile gonadotropin düzeylerini etkilemesi sonucu POY bulguları gerçekleşir. Hipergonadotropik hipogonadizm, anormal galaktoz metabolizması ile de birlikte bildirilmiştir. Galaktozemi, otozomal resesif geçişli bir metabolik hastalıktır ve genetik nedenler arasında açıklanmıştır.

2.2.1.2 Otoimmün

Otoimmün etiyoloji hastaların %20'sinde mevcuttur ve 3 şekilde incelenmektedir (Oldenburg vd., 2008) :

1.Lenfositik ooforit: Histolojik ooforit insidansı %11 olarak bildirilmiştir (Kasipillai vd., 2013). Ooforit primer olarak makrofajların, naturel killer hücrelerinin, T lenfositlerinin, plazma hücrelerinin ve birkaç B lenfositlerinin hücrenel infiltrasyonu olarak tanımlanmıştır. Granüloza hücreleri üzerindeki klas 2 MHC moleküllerinin uyarılması ile lenfositlerin akımının gerçekleştiği düşünölmektedir (Caburet vd., 2014).

2.Over antijenlerine karşı oluşan otoantikörler: POY olgularında antiovaryan antikör insidansı büyük değişiklikler göstermektedir (%0-67). Mevcut ELISA testlerinin değişken olması nedeniyle rollerini ve klinik önemlerini yorumlamak zordur. Antiovaryan antikörler geçici olarak görölebilir ve antikör değerleri ile hastalığın ciddiyeti arasında zayıf bir ilişki mevcuttur. IgG tipindeki steroid hücre antikörleri, overin hilar, granüloza ve teka hücrelerine bağlı olarak bulunmuştur. Ancak, bu antikörler Addison hastalarında izole POY'dan daha çok bulunmaktadır. Addison hastalarının steroid hücre antikörü taşıyanlarının %42,8'inde 10-15 yıl içinde POY geliştiği bildirilmiştir (Oldenburg vd., 2008).

3.Otoimmün hastalıklarla birliktelik: Birçok otoimmün hastalık POY ile birliktelik göstermektedir; hipotiroidizmde %27, diabetes mellitusta %2,5 ve Addison hastalığında %2,5 insidans bildirilmiştir. Addison hastalarının yaklaşık %10'unda POY görölmektedir. POY hastalarının %10'unda da adrenal bezlere karşı otoimmünite gösterilmiştir. POY hastalarının yaklaşık %3'ünde otoimmün poliglandüler sendrom tip I veya II görölmektedir (Oldenburg vd., 2008). Bir alışmada, APS (Auto-polyglandüler -Sendrom) tip 1 'li hastaların %58'inde POY geliştiği görölürken; APS tip 2'li hastalarda POY prevalansı %5-10 olarak bildirilmiştir (Yang vd., 2012).

2.2.1.3 İatrojenik

Sitotoksik ve radyoterapi tedavilerinde görülen yan etkilerin şiddeti doz, kullanılan ajan, tedavi süresi ve hasta yaşına göre farklılıklar gösterebilir. Gonadotoksik etkisi en yüksek olarak bildirilen kemoterapötikler alkilleyici ajanlardır. Kadınlarda metotreksat, fluorourasil ve siklofosfamid kombine tedavi sonrası, 40 yaşın üzerinde %76, 40 yaşın altında %40 amenore bildirilmiştir.

2.2.1.4 Virüsler

Kadınlarda farklı virüslerin ooforit ve yumurtalık yetmezliğine sebep olabileceği bildirilmektedir. Kabakulak geçiren kadınların %2-8'inde, hastalık sonrası kabakulak ooforiti gelişebilir, iyileşmenin ardından over fonksiyonları normale döner. Karın ağrısının eşlik ettiği kabakulak şikâyeti olan hastalarda viral nedenlerden şüphelenilmelidir. CMV (Sitomegalovirüs), shigella, varisella ve sıtma enfeksiyonlarından sonra POY gözleendiği öne sürülse de, net bir ilişki ortaya konmamıştır. Son zamanlarda HIV (Human Immunodeficiency Virus) virüsünün (ya da antiviral terapi) POY'a yol açabileceği belirtilmektedir. 2010'daki bir çalışmada 78 HIV virüslü kadın değerlendirilmiş ve bu kadınlarda, normal popülasyona oranla anormal derecede yüksek antral folikül sayısı (%63), FSH (%36), inhibin B (%57) ve AMH düzeyleri gözlenmiştir (Ohl vd., 2010).

2.2.1.5 Diğer nedenler

Demografik özellikler: POY insidansı etnik kökene göre de farklılık gösterirken eğitim, medeni hal, yerleşim bölgesi ile ilgili net sonuç yoktur. İnsidansı Beyaz Asya ve Japon ırkında %1, Afrika, Amerika ve Hispanic %1.4 ve Çin'de %0.5'dir.

Reprodüktif özellikler: Menarş yaşı, menstrual siklus uzunluğu, parite ve oral kontraseptif kullanımı ovulatuvar siklusların ana belirleyicileri arasındadırlar. Erken menarşın erken menopoz ile bağlantısı ile ilgili bilgiler net değildir. Kısa siklus uzunluklarının, doğal menopoz yaşını 1-2 sene hızlandırmaktadır. Nulliparların erken doğal menopoz yaşı riskine sahip olduklarını öne süren çalışmalar mevcuttur.

Depresyon: Depresyon ve antidepresan tedavinin erken menopozla ilişkilendirilmekle birlikte depresyon over fonksiyonlarının erken kaybının bir markeri olarak da kabul edilmektedir.

Antropometri: Obez kadınlarda endojen estrogen yüksek, seks hormon bağlayıcı globülin (SHBG) değerleri düşüktür. Böylece foliküler büyüme sürekli olarak uyarılıp, daha hızlı bir folikül tüketimine yol açabilir. Artan vücut kitle endeksi ve doğal menopoz yaşı arasındaki ilişki ile ilgili

epidemiyolojik çalışmalara ait net sonuçlar bildirilmemiştir (Alici-Davutoglu vd., 2013).

Sigara kullanımı: Genel olarak sigara içen kadınlar doğal menopoza içmeyenlere göre 1-1.5 yıl daha erken girerler. Sigara dumanında ovaryan germ hücrelerine toksik olabilecek polisiklik hidrokarbonlar bulunmaktadır. Sigara dumanı bileşenleri olan nikotin ve anabasin gibi maddeler, granülosa hücre aromatazi ve östrojen sentezindeki diğer enzimlerin yapısını değiştirerek inhibe olmasına neden olmaktadır. Sigaranın kullanım yoğunluğu ve süresi ile ilgili net bağlantı ortaya konamamıştır.

Vitamin D: D vitamini, çinko ve bakır oranlarının tanımlanması için yapılan çalışmada 35 POY ve 28 kontrol grubu kullanılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında POY grubunda, serum bakır düzeyleri önemli oranda yüksek gözlenirken, serum vit D ve çinko oranlarının önemli ölçüde düşük olduğu gözlenmiştir. FSH ve vit D oranları ters ilişkili bulunmuştur. Östrojen D vitamininin aktif formunu artırır. POY'da gözlenen östrojen salınımının azalması nedeni ile D vitamini aktivasyonu azalmış olabilir (Kebapçılar vd., 2013).

2.2.2 Genetik nedenler

POY'un genetik nedenleri hem X kromozomu hem de otozomal kromozom kaynaklı sayısal veya yapısal yeniden düzenlenmeler olabileceği gibi tüm genom kaynaklı gen mutasyonları da olabilir. Son yıllarda yapılan Genom ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ve CNV çalışmaları ile sendromik ve sendromik olmayan POY ile idiyopatik POY olan aile gruplarında aday gen belirleme çalışmaları devam etmektedir.

Kromozom anomalileri POY'da ortak neden olarak tanımlanmıştır ve reproduktif yönetimde kromozom analizinin önemi doğrulanmıştır. Sayısal ve yapısal kromozom anomalileri, özellikle X kromozomunun yapısal anomalileri (translokasyonlar, delesyonlar, izokromozomlar), X-otozomal kromozom translokasyonları ve ilişkili X kromozomu anöloidileri literatürde en çok tanımlanan kromozom anomalileridir. POY olgularında kromozom anomalisi oranı bir çalışmada ortalama %10-25.3 arasında (Ayed vd., 2014) saptanırken bir diğer çalışmada bu oran %8.8-%32 arasında (Ceylaner, Altinkaya, Mollamahmutoglu, & Ceylaner, 2010) bildirilmiştir. Bu değer ülkemiz için %22.7 (Ceylaner vd., 2010) %25 (Geckinli vd., 2014) arasında bildirilmiştir. Bu kromozom anomalilerinin %50-80 kadarı X kromozom anöloidileri ve yeniden düzenlenmeleridir.

Tablo 2.3'de POY hastalarında görülen kromozom anomalileri ve sıklık oranları verilmiştir.

Tablo 2.3:POY hastalarında kromozomal anomalilerin görülme sıklığı

Anomali	POY'da sıklığı
45,X	%1.3-%11.7
47,XXX	%0.3-%2.7
Mos X (sayısal)	%0.18-%5.3
46,XY	%0.37-%6.8
X kromozomu yapısal düzensizlikler	%3.3-%10.6
X-otozomal kromozom translokasyonları	%0.4-%1.7
Otozomal anomaliler	%0.18- %1.6

2.2.2.1 Otozomal kromozom yeniden düzenlenmeleri

POY olgularındaki otozomal kromozomlar arası yeniden düzenlenmelere ait bugüne kadar 46,XX,t(2;15)(q32.3,q13.3) iki olgu ve 45,XX,t(13;14) bir olgu olmak üzere toplam üç olgu bildirilmiştir (Hens vd., 1989). Vichinsartvichai ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 23 olgu incelenmiş ve t(1;4)(p34.1;q34) resiprokal translokasyon saptanmıştır. Kromozom 4'de kırık bölgesine lokalize *caspase-3* geninde meydana gelen değişikliklerin POY ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Vichinsartvichai, Manolertthewan, & Promrungrueng, 2014).

2.2.2.2 Cinsiyet kromozom anomalileri

Gonad gelişim bozukluklarının diğerleri ise Swyer Sendromu (46,XY) ve 46,XX pure gonadal disgenezisidir. Etkilenen bireyler fonksiyonel olmayan over ile doğdukları için (bilateral streak gonads) bu bireylerde primer amenore bulunmaktadır. Bu hastalarda ovaryan kanserleri önlemek için ovariectomi uygulanabilir.

Gonadal disgenezis sendromlarında ana aday gen, Y kromozomu kısa kolunda lokalize (Yp11.3) *SRY* (Sex-Determining Region Y) erkek cinsiyetinin oluşumundan sorumludur.

Y kromozomuna ilişkin Cheng DH ve arkadaşları tarafından sunulan bir çalışmada 33 yaşında POY olan bir olguda Y kromozom heterokromatin bölgesi ve X kromozomu inaktivasyon bölgesi arasında gerçekleşen translokasyon sonucu oluşan derivatif X kromozomunda inaktivasyon rapor edilmiştir. Kadınlarda görülen Y kromozomu varlığının, çoğunlukla da mozaik karyotiplerin gonadoblastom oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Cheng, Tan, Di, Li, & Lu, 2009).

2.2.2.3 X kromozomu yeniden düzenlenmeleri

POY olgularında X kromozom anomalileri, otozomal kromozom anomalilerine göre daha sık gözlenmektedir. Aynı şekilde X kromozomu uzun (q) koluna ilişkin anomaliler de, kısa (p) kol anomalilerine göre daha yüksek sıklıktadır. X kromozomunda ovaryan gelişme ve fonksiyonunda rol oynadığı bilinen Xq13.3–q21.1 (POF2) ve Xq21.3–q27 (POF1) bölgeleri POY için kritik genlerin yoğun olarak bulunduğu bölgeler olarak bildirilmektedir. X kromozomunun kısa kolunda meydana gelen delesyonlar, primer amenore ile sonuçlanırken; uzun kolundaki delesyonlar ise primer veya sekonder ovaryan yetmezlik olarak karşımıza çıkmaktadır. Sekonder ovaryan yetmezlik, puberteden sonra ortaya çıkan, folikül fonksiyonunda bozukluk veya erken folikül yıkımı sonucunda gelişen bir tablodur.

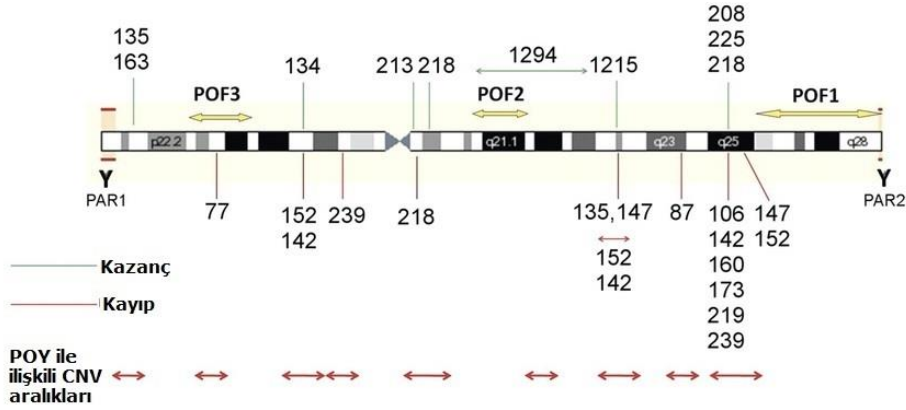
46,Xdel(X)(p11) saptanan bireylerin %40'ında spontan menstruasyon başlarken, X(q21.3-27) delesyonu olan vakaların %75'inde POY görülmektedir (Krauss vd., 1987).

POY'a neden olan mekanizmalardan biri X kromozomu parsiyel delesyonlarında "gen dozaj etkisi"; yani X inaktivasyonundan kaçan genlerin anlatımının yapılamamasıdır. Diğer mekanizma ise; normalde X inaktivasyonundan kaçamayan genlerin X kromozomu üzerinde kırılma noktasında yer almaları ve bu genlerin hasara uğramasıdır. Bununla birlikte, her iki tip Xq düzenlenmesinde de (delesyon / translokasyon), genlerin haploid düzeydeki yetmezliği (haploinsufficiency) söz konusudur (Alici-Davutoglu vd., 2013).

Veriler POY ile ilişkili genlerin X kromozomunun uzun kolunda POF1 (Xq26.2–q28) ve POF2 (Xq13.3–q22) lokuslarında kümelenmiş olduğunu göstermektedir. Non sendromik POY olgularında tespit edilen yeniden düzenlenmelerin olduğu X kromozomunun uzun kolundaki bölgelerin gen içerikleri *CHM* (Choroideremia (Rab Escort Protein 1)), *DIAPH2* (Diaphanous-Related Formin 2), *DACH2* (Dachshung homolog 2 (Drosophila)), POF1B (Prematüre Ovarian Failure, 1B) ve XPNPEP2 (X-Prolyl Aminopeptidase (Aminopeptidase P) 2, Membrane-Bound) olarak belirlenmiştir. Ancak bu genlerin over fonksiyonlarındaki rolleri hala belirsizdir (Persani vd., 2010). POF1 lokusunda *FMR1*, *HS6ST2*, *TFDP3*, *GPC3* ile POF2 lokusunda *DIAPH2*, *DACH2*, *POF1B* genleri POY için aday genler olarak öne sürülmüştür.

Ayrıca X kromozomu kısa kolu Xp11.1 ve Xp21 bölgesindeki yeniden düzenlenmelerde bu hastalık grubu için önemlidir. Çünkü 46,X,del(X)(p11), Xp21.1 ve Xp22.1 delesyonu olguların çoğunda primer amenore, gonodal disgenezis ve POY tanımlanmıştır. Xp11.4'de lokalize *USP9X*, Xp21.2'de lokalize *NROB1* gen delesyonu olan olgularda POY fenotipi gözlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Xp'de lokalize *SHOX* gen delesyonlarının Turner Sendromu, Leri-Weill Sendromu ve

idiyopatik boy kısalıklarında duplikasyonlarının ise POY sendromu ile ilişkili olduğunu gösteren veriler bulunmaktadır (Tachdjian vd., 2008). İdiyopatik 42 POY hastasında yapılan X kromozomu array çalışması sonucu 22 CNV bölgesi belirlenmiş; bunların 3'ü kazanç, 4'ü kayıp olmak üzere toplam 7 tanesi kromozom Xp' de, buna karşılık 5'i artış, 10'u azalma olmak üzere toplam 15 tanesi de Xq da bildirilmiştir. Aynı çalışmada Xp'de lokalize *ZFX* (Xp22.1 -21.3) ve *BMP15* (Xp11.2) genlerinin dâhil olduğu bölgeler POF3 grubu olarak tanımlanmıştır (Quilter vd., 2010) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: X kromozomu üzerinde POY ile ilişkili CNV'ler

Sekonder amanoresi ve boy kısalığı olan 24 yaşındaki bir POY olgusunda yapılan moleküler sitogenetik analizde, Xp11.2-p22.1 bölgesi için intersitisyel delesyon saptanmıştır. Temel moleküler çalışmalar; delesyon noktalarının distalde DXS1058 ve DXS6810; proksimalde de DXS1302 ve ZXDB olduğunu ve bu aralığın Turner Sendromu için kritik bölge ile örtüştüğünü bildirmiştir. Delesyona uğrayan SW239 bölgesinin aktivasyondan kaçış için birçok gen içerdiği bilinmektedir. SW239 bölgesinin kısa boyla ilişkisi tam aydınlatılamamış, ancak POY için literatürde yer alan *USP9X* ve *BMP15* aday genlerini içerdiği bilinmektedir. Bu nedenle DXS1058, DXS6810, DXS1302 ve ZXDB spesifik markerlarının FISH yöntemi ile analizinin bu hasta grubunda literatüre katkı sağlayacağı öne sürülmüştür (Zinn & Ross, 2001).

X kromozomu ve Otozomal kromozom yeniden düzenlenmeleri: Yukarıda belirtilen verilerin yanı sıra POY olgularında, X kromozomu ve otozomal kromozomlar arasında meydana gelen translokasyonlar da incelenmiştir. Bu çalışmalarda X kromozomu genlerinin olduğu kadar otozomal genlerin katılımının da POY gelişmesine etkisi araştırılmıştır. Bu tanımlanan translokasyonlara örnek olarak;

46,X,der(X)t(X;19)(p21;q13), kromozom 19q13 bölgesinde *MATER*,
46,X,t(X;2)(q21q14), kromozom 2q21 bölgesinde *HS6ST1*,

46,X,der(X)t(X;Y)(q25-26;q11.22), kromozom Xq26 bölgesinde *HS6ST2*,
 46,X,t(X;13)(q13.3;q31), POF2 kritik bölgesi,
 46,X,t(X;4)(q21.2;p16.3) kromozom Xq21 bölgesinde *CHM*

genlerinin POY ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Baronchelli vd., 2012). Bu durumda hastalık oluşması için olası mekanizma, bir otozom-X kromozomu translokasyonunun konumsal etkisi olarak açıklanabilir. X kromozomunun yüksek derecede heterokromatin bölgesine bu genlerin transferi sonucunda, oluşan bu yeniden düzenlenmeler ile X kromozomunun kromatin yapısının değişmesi ve/veya kırık bölgelerindeki muhtemel kriptik delesyonlar olarak açıklanabilir (Rizzolio vd., 2009). Tablo 2.4'de Genecard'a uygun olarak X kromozomu üzerindeki gen bölgeleri ve ilişkili hastalıklar bildirilmiştir.

Tablo2.4: X kromozomu üzerindeki gen bölgeleri ve ilişkili hastalıklar (Fortuño & Labarta, 2014)

Gen	Kromozomal bölge	Diğer ilişkili hastalıklar
<i>CHM</i>	Xq21.1-q21.3	Koroïderemi
<i>DIAPH2</i>	Xq21.33	-
<i>DACH2</i>	Xq21.3	Allan-Herndon-Dudley sendromu
<i>POF1B</i>	Xq21.2	-
<i>XPNPEP2</i>	Xq25	Anjioödem
<i>NXF5</i>	Xq22.1	Pelizaeus Merzbache hastalığı, entelektüel bozukluk
<i>FMR1</i>	Xq27.3	Fragil X sendromu
<i>FMR2</i>	Xq28 XE	XE Fragil sendromu, zihinsel engelli
<i>XIST</i>	Xq13.2 X	X inaktivasyonu, ailesel skewed, testis kanseri
<i>CENP1</i>	Xq22.1	Skleroderma, karaciğer hastalığı
<i>PGRMC1</i>	Xq22-q24	Plasenta koryokarsinoması, sfenoid sinüzit
<i>AR</i>	Xq12	Androgen duyarlılık sendromu
<i>FOXO4</i>	Xq13.1	Malign melanom işsi hücreli, X'e bağlı distoni-parkinsonizm
<i>AGTR2</i>	Xq22-23	Serebrovasküler hastalık, Conn sendromu
<i>BHLHB9</i>	Xq22.1	Kolon kanseri, Alzheimer hastalığı
<i>BMP15</i>	Xp11.2	Turner sendromu
<i>ZFX</i>	Xp22.1-21.3	Retinoskizis, Turner sendromu
<i>SHOX</i>	Xp22.33	Leri Weill Diskondrosteozu, Turner sendromu

Trizomi X Sendromu: Endokrin bozukluğu olan hipergonadotropik hipogonadizm hastalarda tanımlanan X kromozomu anöploidisi dolayısıyla, inaktivasyondan kaçan genlerin aşırı ekspresyonunun over fonksiyonlarında bozukluğa neden olabileceği düşünülmektedir. Trizomi X'deki durum ve bununla beraber Turner Sendromu'ndaki X kromozomu yokluğunun reproduktif sistem bozukluğuna yol açması normal ovaryan fonksiyonların gerçekleşebilmesi, folikül apoptozisinin ve atrezisinin önlenmesi için iki intak X kromozomunun da bulunması gerekliliğinin önemini göstermektedir. Mozaik olan Turner Sendromu olgularındaki folikül sayısının mozaik olmayan olgulara göre daha yüksek olması bu hipotezi desteklemektedir.

Trizomi X'in insidansı 1/1000 canlı doğum olarak bildirilmiştir. 47,XXX olgularında gözlenebilen endokrin gonadotropin hormon yüksekliği POY etiyolojisinde etkili olsa da bu hastalarda POY gözlenme sıklığı %3; POY olgularında trizomi X sendromu insidansı ise %0.3-%2.7'dir. Bu hastaların çoğunda ovaryan fonksiyonlar normaldir ancak bazı olgularda, ovaryan disfonksiyon, erken menopoz ve oligoamenore bildirilmiştir. Mozaik karyotip, olguların %10'unda bildirilmiştir. Post-zigotik kromozom ayrılama veya post-zigotik trizomiden kaçış, mozaikizm için olası mekanizmalar olarak bilinmektedir (Cordts, Christofolini, dos Santos, Bianco, & Barbosa, 2011).

Turner Sendromu: 45,X karyotipine sahip bireylerde ovaryan foliküller doğumla birlikte dejenerer olurlar. Turner Sendromu, sayısal kromozom anomalileri içinde yaşamla bağdaşan, en sık rastlanan kromozomal anomalidir. POY'un en sık nedenlerinden biridir ve 2500 canlı kız doğumda bir görülür. Gebeliklerin %1,5'inde ve ilk trimester spontan düşüklerin %10'unda rastlanır. Gonadlar atretik folikül (çizgi gonad) oluşumundadır. Primer amenore, kısa boy, yele boyun, morfolojik bozukluklar, kare şeklinde göğüs, farklı derecelerde over disfonksiyonu gözlenmekle beraber pubertal gelişim yoktur. İntrauterin hayatta over gelişimi normal olup doğumdan sonra, hızlanmış bir foliküler atrezi görülür. Turner Sendromu'nda, en sık 45,X (%53) karyotip gözlenmekle birlikte, mozaikizm; 45,X/46,XX; 46XX/47XXX; 48,XXXX/49,XXXXX gibi değişken karyotipler bildirilmiştir. Simona B. ve arkadaşları tarafından 269 POY olgusunda yapılan sitogenetik analizde 45,X ve 47,XXX oranı kontrol grubunda sırasıyla %2,7 ve %0,6 olarak bildirilirken POY olgularında bu oran sırasıyla %7.5 ve %3,3 olarak, mozaikizm oranı 45,X/46,XX; 46XX/47XXX için ayrı ayrı %1,1 olarak bildirilmiştir (Baronchelli vd., 2011).

Frajil X Premutasyonu: *FMR1* geni (Frajil X Mental Retardasyon 1), kromozom Xq27.3'de lokalize, 38 kb uzunluğunda 17 ekzondan oluşan, 4.4 kb'lık transkripti kodlayan ve 70 kDa'luk bir protein sentezleyen bir gendir. Gen, 5' ucunda CpG metilasyon bölgesi ve birinci ekzon'un translate olmayan kısmında CGG (sitozin, guanin, guanin) trinükleotid tekrarları içerir. CGG trinükleotid dizisinin tekrarları ile oluşan dinamik mutasyonu nedeni ile ekspansiyon ve anormal metillenme sonucu genin fonksiyonu bozulur ve Frajil X Sendromu (FXS)(OMIM 300624) meydana gelir (Loutradis vd., 2006). FXS'nun %98-99'u *FMR1* genindeki dinamik mutasyon ve anormal metillenme nedeni ile oluşurken; %1-2'si ise bu gendeki delesyonlar ve nokta mutasyonları sonucu oluşmaktadır. FXS Down sendromundan sonra mental retardasyonun eşlik ettiği hastalıklar grubunda ikinci sırada, ailesel mental retardasyonlar grubunda ise ilk sırada yer almaktadır. Toplumda erkeklerde ~1/4000, kadınlarda ~1/8000 oranında gözlenmektedir. *FMR1* geni üzerindeki CGG trinükleotid dizisi normal bireylerde genellikle 5-44 arasında tekrara sahipken, 45-54 arasındaki tekrarlar "gri bölge", 55-200 arasındaki tekrarlar Frajil X premutasyon allelleri olarak tanımlanır. Tam etkilenmiş bireylerde CGG

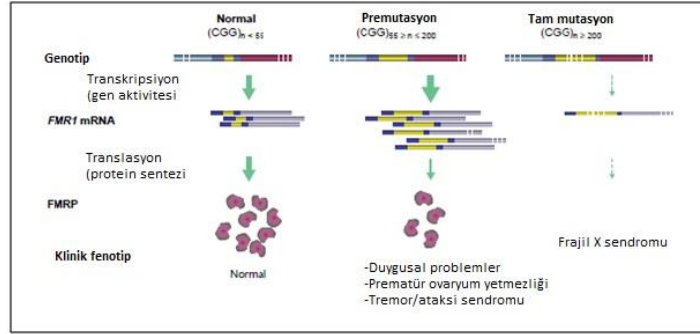
trinükleotid dizisi >200 tekrar (tam mutasyon) sayısı bulunur. Klinik bulgular otizm, dikkat eksikliği sendromu (ADD /ADHD), hiperaktivite ve bağ doku bozuklukları ve konvülziyonlar olarak tanımlanabilir. Mozaisizm durumunda da benzer değişiklikler görülür ancak bulgular daha hafiftir (Sherman, 2000).

CGG tekrar sayısı 55-200 arasında olan premutasyon taşıyıcıları, tekrar sayısının artışıyla tam mutasyona dönüşme riski taşır. Premutasyon taşıyıcısı kadınlarda mayoz bölünme sırasında trinükleotit tekrarlarının artarak bir sonraki jenerasyona geçmesi antisipasyon olarak adlandırılır. Bu nedenle kalıtımı X'e bağlı kalıtılan hastalıklardan farklıdır. Premutasyon POY hastalarında yapılan çalışmalarda %3-15 arasında POY nedeni olarak sunulmuştur. Bir nesilde tam mutasyona dönüştüğü bilinen en küçük CGG tekrar sayısı 59 olarak bildirilmiştir. Genel popülasyonun ~%1'inde POY gözlenirken, premutasyon taşıyıcısı kadınların ~%20'sinde POY gözlendiği, POY olan kadınlarda premutasyon taşıyıcılığı oranının ~%6 olduğu bildirilmektedir (Bennett vd., 2010; Welt, 2008). Bir çalışmada Türk popülasyonuna ait POY olgularının %6,6'sında premutasyon taşıyıcılığı bildirilmiştir (Tural vd., 2014). Frajil X premutasyonu, sporadik olarak da ortaya çıkabilir (Bussani vd., 2004).

Premutasyon taşıyıcıları frajil X tremor ataksi sendromu (FXTAS) ve frajil X primer over yetmezliği (FXPOI) hastalıkları için riskli guruptadır. Premutasyon olduğu düşünülen olgularda bir sonraki nesilde tam mutasyon (FXS) için artmış risk mevcuttur. Oysa FXTAS ve FXPOI premutasyon durumu ile ilişkilidir. Premutasyon taşıyıcısı bireylerde depresyon, anksiyete, dikkat zorlukları, hipertansiyon, tiroid hastalığı, fibromiyalji, migren gibi duygusal ve bilişsel sorunlar genel popülasyona oranla daha yüksek frekansta gözlenmektedir (Wheeler vd., 2014).

Altta yatan moleküler mekanizma FXTAS için mRNA fonksiyon kazancı mutasyonu sonucu *FMR1* protein ürünü ve intranukleer inklüzyon fazlalığı olarak düşünülse de FXPOI için benzer bir mekanizma söz konusu olmakla beraber kesin değildir. Frajil X Sendromunda tam mutasyon aralığında (>200 CGG tekrarı), *FMR1* genindeki hipermetilasyon nedeniyle protein düzeyinde azalma olmaktadır. Premutasyon aralığında ise ilginç olarak FMRP düzeyinin azalmasına rağmen, *FMR1* gen transkripsiyonu azalmaz hatta premutasyon aralığında mRNA düzeylerinde artış gözlenir (Şekil 2.4) (Hagerman & Hagerman, 2002). Artan mRNA düzeyine karşın FMRP'nin azalması, translasyon etkinliğindeki azalmanın öncelikle protein düzeyindeki azalmadan sorumlu olduğunu, bu durumun artan mRNA düzeyinin transkripsiyonda dengeleyici uyaran rol oynadığını göstermektedir. CGG tekrarlarının artması ile oluşan kararlı yapının translasyonun başlamasını bloke edebileceği düşünülmektedir. DNA oligomerlerinde tetrahelikal CGG tekrarları gözlenmesine rağmen (Tassone vd., 2000; Weisman-Shomer, Cohen, & Fry, 2000), İn vivo 5' UTR bölgelerinde benzer yapıların oluştuğuna ve artan CGG tekrarlarının

ribozomal birimlerin hareketini engellediğine yönelik direkt kanıt gözlenmemiştir (Wheeler vd., 2014).



Şekil 2.4: Normal, premutasyonlu ve tam mutasyonlu bireylerde *FMR1* gen anlatım modelleri (Hagerman & Hagerman, 2002).

Premutasyon tanımlanan olgularda tekrar sayısı ve POY'un gözlenmesi arasında daha önce bazı tahmini zamanlamalar ilişkilendirilmiş olsa da son çalışmalarda bunun belirsiz olduğu bildirilmiştir (Voorhuis vd., 2013; Welt, 2008)

Frajil X premutasyonu taşıyan POY olgularının yardımcı üreme tedavilerine verdikleri yanıt iyi değildir. Bu olgular tam mutasyonlu çocuklara sahip olma riski taşıdıkları için, preimplantasyon genetik tanı (PGD) tekniğinin kullanılması konusu tartışılmaktadır. Fragile X için PGD diğer genetik hastalıklardan daha zordur ve düşük over rezervi olması olasılığının yüksek olmasından dolayı kötü cevap alınabileceği konusunda çiftlerin bilgilendirilmesi gerekliliği bildirilmiştir (Bambang, Metcalfe, Newman, & McFarlane, 2011; Platteau vd., 2002). Ancak 31 yaşında premutasyon taşıyıcısı bir kadında in vitro oosit maturasyonu (IVM) protokolü uygulanmış ve başarılı olunmuştur. Bu olgu *FMR1* premutasyonu, düşük over rezervi olup tedavi ile başarılı bir hamilelik ve canlı doğum gerçekleşen ilk olgudur (Nayot vd., 2013). Frajil X tam mutasyonu olan kadınlarda POY sık olmamakla birlikte, erken menopoza girme eğilimi söz konusudur (Fast ve Abrams, 2006).

2.2.2.4 X kromozomuna lokalize POY ile ilişkili genler

FMR1 geni yakınlarındaki FRAXE lokusunda *FMR2* geni bulunmaktadır. Bu genin delesyon tipi mutasyonları mental retardasyona neden olurken POY olgularının %1.5 kadarında da mikrodelsyonlar bildirilmiştir (Murray, Webb, Dennis, Conway, & Morton, 1999).

XIST (X-Inactive Specific Transcript) geni X kromozomu inaktivasyon kritik bölgesinde (Xq13,2-q27) lokalizedir. Bu gendeki anomaliler POY'a neden olabilmektedir. *XIST* geni anomalileri sonucu inaktivasyon problemi oluştursa over fonksiyonlarını etkileyebilmektedir (Simpson, 2008).

CENPI (Centromere Protein I) geni *FSHPRH1* (FSH Primary Response Protein 1) olarak da adlandırılır ve kromozom Xq22.1 bölgesine lokalizedir. FSH gelişimine gonadal cevabın verilmesinde rol alır, mutasyonlarında gametogenez ve over gelişmesi etkilendiği için POY olgularında aday gen olarak bildirilmektedir (Goswami & Conway, 2005).

PGRMC1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1) geni progesterone bağlanma proteinin kodlayan bir gendir. Foliküler gelişimde düzenleyici rol oynadığı için ekspresyon değişikliklerinde kadınlarda farklı formlarda infertilite bildirilmiştir. Çin'de 196 POY, 200 kontrolde yapılan çalışmada sadece POY olgularında C.556C>T mutasyonu saptanmıştır (J.-L. Wang, Li, Qin, & Chen, 2014).

AR (Antrene Reseptör) geni POY olgularında kontrol popülasyona göre CAG tekrarları daha uzun olduğu için aday gen olarak kabul edilmiştir (Chatterjee vd., 2009).

The *FOXO4* (Forkhead box O4) geni insülin sinyal yolağının düzenlenmesinde rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin kodlanmasından sorumludur. Aday gen olarak bildirilmesine karşın Tunus'ta 116 POY, 143 kontrol kullanılarak yapılan popülasyon çalışmasında her iki grupta da IVS2 + 41T > G sekans varyantı tanımlanmış ve bu genin mutasyonlarının POY ile ilişkisinin toplumlara göre değişiklik gösterebileceği bildirilmiştir (Fonseca, Garzón, vd., 2012).

AGTR2 (Angiotensin II Receptor, Type 2) geni fetus ve granüloza hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen membrane protein kodlar ve POY ile ilişkilidir.

BHLHB9 (Basic Helix-Loop-Helix Domain Containing, Class B, 9) geni hücre yaşlanma ve sağ kalımda rol oynamaktadır (De Vos vd., 2010). Ayrıca Beke, A. ve arkadaşlarının 27 yaşındaki bir POY olgusunda mikro dizin analizinde ChrX q21.31-q28 bölgesinde, *POF1B*; *BHLHB9*; *DACH2*; *DIAPH2*, *FMR1*; *FMR2*; *XPNPEP2*; *PGRMC1*, *CENP1*, *BCORL1* genlerinin delesyonu gözlenmiştir (Beke vd., 2013).

Xp'de lokalize diğer aday genler *BMP15*, *ZFX* ve *SHOX* genleridir. *BMP15* geni iki ekzondan oluşur ve Xp11.2 lokalizedir, değişiklikleri ile oluşan fenotip OMIM'de POF4 olarak tanımlanmakta olup, *Gdf9b* olarak da bilinir. Over folikülünün erken gelişim aşaması ile antral folikülün morfojenik gelişim aşamasında oositten kaynaklı parakrin faktörlerin rolü büyüktür. Sinyal peptidinin ayrılmasından sonra, proprotein bir furin-benzeri proteazı ile bölünerek olgun proteinlerin oluşturulur. Transforming growth factor- β (TGF- β) süper ailesine, geniş bir protein grubuna ait olup ovarian fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rolü vardır. *BMP15* primer foliküldeki oositten eksprese olur. Granüloza hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ederek folikül büyümesini prime evreden FSH bağımlı aşamaya ilerlemesini indükler ve FSH tarafından indüklenen progesteron üretimini

baskılar. *BMP15* geninin fonksiyonu sadece dişi eşey hücresiyle sınırlı olmayıp, ilişkili gonad dokularında da anlatımı yapılmaktadır.

BMP15'in protein ürünü *GDF9* ile %52 homoloji gösterir. *GDF9* 5q31.1 lokalizedir. *Bmp15* ve *GDF9* proteinleri over fonksiyonlarında sinerjik etki göstermektedirler. Popülasyona bağlı çalışmalarında primer, sekonder amenore ile ilişkili POY olgularının %1.5-12'sinde (Persani vd., 2010). 46,XX idiyopatik POY olgularının %4,2'sinde *BMP15* geninin farklı mutasyonları tespit edilmiştir (Di Pasquale vd., 2006).

Hayvan çalışmalarında *BMP15*'den yoksun dişi farelerde ovulatuvar defektlere bağlı olarak fetus gelişim gerilikleri, ovulasyon ve folikülogezisin geç dönemlerinde defektler sonucu fertilitate problemleri gözlenmiştir. Özellikle koyunlarda *GDF9* ve *BMP15* defektlerinin ovulatuvar fonksiyon kaybı, molekül immunizasyon yoluyla ya da genetik eksiklik yoluyla over yetmezliğine yol açtığı gözlenmiştir. *BMP15*'de dozaj etkisi mevcuttur, heterozigot bireylerde ovulasyon oranında artışa bağlı olarak çoğul gebelikler gelişirken homozigot mutantlarda folikül gelişimi primer aşamada durdurulmaktadır. Sıçan granül hücrelerinde FSH reseptör ekspresyonunu baskılayarak FSH etkisini değiştirdiği bildirilmiştir (Yan vd., 2001).

Hipoplastik gonad ve primer amenoreye sahip iki kız kardeşte yapılan çalışmada *BMP15* geninde bir heterozigot varyant c.704A > G (p. Tyr235Cys) tek aminoasit değişikliği saptanmış ve babanın mutasyon açısından hemizigot olduğu gözlenmiştir (Di Pasquale, Beck-Peccoz, & Persani, 2004). 538G > A, 308A > G, 788insTCT, 852C > T literatürde tanımlanan mutasyonlardan bazılarıdır.

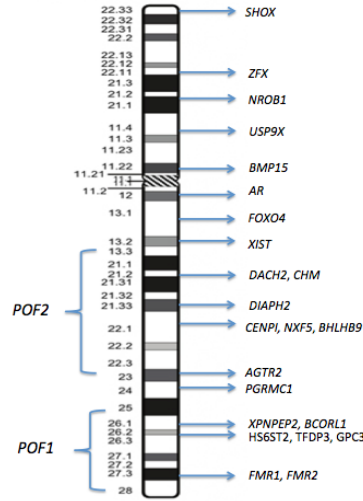
ZFX (Zinc Finger X) geni *ZFY* ile homologdur. Transkripsiyon aktivatörü olarak rol oynar. Hayvan çalışmalarında *ZFX* çıkarılmış farelerde germ hücre sayısının düştüğü rapor edilmiştir (Simpson, 2008).

SHOX gen delesyonlarının Turner Sendromunda kısa boy, duplikasyonlarının ise POY sendromu ile ilişkili olduğu çalışmalar bulunmaktadır (Tachdjian vd., 2008).

X kromozomunda lokalize *NROB1* (Nuclear Receptor Subfamily 0, Group B, Member 1) geni embriyo gelişimi etkileyebileceği düşünülen bir genidir, *DHH* (Desert Hedgehog) geni ise kromozom 12'de lokalize testis gelişimini etkileyen genler olarak tanımlanmışlardır (Fortuño & Labarta, 2014). Sonuç olarak X kromozomu üzerinde tanımlanan genler Şekil 2.5'de özetlenmiştir.

X-otozom translokasyon t(X;15)(Xq22;p11) taşıyıcısı olan 19 yaşında primer amenoresi olan bir bayanda X kromozomu 22 bölgesinde bulunan *NXF5* (Nuclear RNA Export Factor 5) geni *FMR1* geni ile fonksiyonel homoloji gösterir ve mRNA'nın nükleer taşınmasından sorumlu olduğu için

POY olgularında aday gen olarak literatürde belirtilmiştir (Bertini, Ghirri, Biccocchi, Simi, & Valetto, 2010).



Şekil 2.5:X kromozomu üzerindeki POY ile ilişkili genler

2.2.2.5 POY ile ilişkili otozomal genler

a-) Sendromik POY ile ilişkili genler: *FSHR*, *GNAS*, *FOXL2*, *GALT*, *AIRE*, *STAR*, *CYP17A1*, *CYP19A1*, *eIF2B*, *NOG*, *ATM*, *POLG*, *PMM1*, *BMP1B*, *ADAMTS19* ve *GJA4* genleri sendromik POY ile ilişkilendirilmiştir.

FSHR (Folikül Uyarıcı Hormon Reseptör), 2p21-p16 bölgesinde bulunur ve FSH reseptörünü kodlar. 10 ekzondan oluşur ve genomik DNA'da 54 kb boyutundadır. *FSHR* proteininin 7 adet trans-membran segmenti içerdiği düşünülmektedir. Ayrıca dişi ve erkek üreme siklusunun kontrolünde en önemli hormonlardan biri olan FSH'a bağlanır. *FSHR* genindeki mutasyonlar, prematür ovaryum yetmezliğini de içeren fizyolojik fonksiyonunda çeşitli değişikliklere yol açar. *FSHR* bozukluğunun derecesine bağlı olarak mutasyonlar primer ya da sekonder amenore (adet kesilmesi) ile sonuçlanabilir ve sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişiminde değişikliklere yol açabilir (Fortuño & Labarta, 2014).

Bu gendeki antisens mutasyon için homozigot olan kadınlarda kalan folikül rezervi işlevsel değildir ve gonadotropin dirençli over sendromu tanısı alırlar. Doğru kopyasını sentezleyen adenovirüsün kullanılarak gen terapisi farelerde doğurganlık yönünden başarılı olmuştur (Ghadami vd., 2010).

Yunan popülasyonunda, 33 POY, ovulasyon indüksiyonuna zayıf yanıt veren 8 kadın ve 20 kontrol ile yapılan çalışmada hastaların ve kontrollerin hiç birinde C566T (Ala189Val) inaktive edici mutasyon açısından homozigot veya heterozigot mutasyon saptanmamıştır (Loutradis vd., 2006).

Çin’de 40 POY ve 60 PKOS olgusu ve 92 sağlıklı bireyin katıldığı çalışmada kontrol çalışmada kontrol grubu ve hastalar arasında *FSHR* mutasyon varyantları açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Du vd., 2010).

Türk kadın popülasyonuna yönelik 50 primer infertile ve 50 kontrol grubunda yapılan çalışmada -29G/A, Ala307Thr, Ser680Asn polimorfizmleri, Ala189Val ve C566T mutasyonları taranmış, FSH seviyeleri ve infertilite ile arasında bir ilişki saptanmamıştır (Etem, Kuyucu, Ardiçoğlu, & Yüce, 2006).

FSH ve LH β alt birimini kodlayan genlerdeki mutasyonlar, sırasıyla normal ve düşük FSH düzeyleri, primer ve sekonder amenore durumlarda ile ilgilidir.

GNAS (Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein) Alpha Stimulating Activity Polypeptide 1) adenilat siklazın hormonal düzenlenmesinde rol oynayan bir G proteini kodlar. Mutasyonunda “pseudohypoparathyroidism type1a” olarak adlandırılan hormon direnç durumu oluşur (Persani vd., 2010).

FOXL2 (Forkhead Box L2) 3q22.3’de lokalizedir ve OMIM’de POF3 fenotip ile ilişkilendirilmiştir. “Forkhead” proteinleri, omurga ve embriyonik doku gelişiminde önemli rol oynar. Bu genin mutasyonları Blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome (BPES) ile ilişkilidir. Göz kapağı malformasyonlarının dominant geçişi ile karakterize genetik bir hastalık olan BPES’in blefarofimozis, pitozis, epicanthus inversus ve telekantüs olmak üzere dört ana oküler karakteristiği vardır. Bu sendromun iki tipi vardır. Birinci tipi POY ile ilişkilidir, ikinci tipinde fertilitate etkilenmez. Bu gendeki mutasyonlar gözkapığında hiçbir malformasyona neden olmadan da POY’a neden olabilir. Bu nedenle sendromik olmayan POY için bir başka aday gen olarak gösterilmektedir (Harris vd., 2002). Son zamanlarda, BPES tip 1 POY’dan etkilenmiş 30 yaşındaki bir kadına gonadotropinlerle over stimülasyonu uygulanması ile ikiz gebelik ve canlı doğum bildirilmiştir (Roth & Alvero, 2014).

GALT (Galactose-1-Phosphate Transferaseuridylyl) geninin mutasyonları sonucu glukozun galaktoza metabolize olmasındaki yetersizlik ile karakterize nadir genetik metabolik bir hastalık olan “galactosemia” oluşur. Galaktosemili hastaların neredeyse tamamında POY gelişir çünkü overlerde biyokimyasal hasar oluşur ve fertilitate sorunları vardır. 2008’de 50 Galaktosemi olan kadında spontan gebelik olduğu rapor edilmiştir (Gubbels, Land, & Rubio-Gozalbo, 2008).

AIRE (Autoimmune Regulator) gen timik medullada eksprese edilen bir otoimmün regülatör proteini kodlar. Bu genin mutasyonları Autoimmune Syndrome type 1 veya Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy (APECED) adı verilen hastalığa neden

olur. Bu hastalığın bileşenleri: Addison hastalığı, hipoparatiroidizm ve mukokutanöz kandidiyazistir. Tüm etkilenen bireylerin neredeyse yarısından fazlasında stroid over hücreleri ve steroidogenik enzimlere otoimmün cevaptan dolayı POY gelişir. Tip 2 de POY ile ilişkilidir, ancak genetik nedeni bilinmemektedir. Folikül varlığının olduğu durumlarda bu sendrom tedavi edilebilir ve yardımcı üreme teknikleri uygulanmaksızın gebelik oluşabilir. İmmünoterapi tedavisi kortikosteroidlerle yapılır (Fierabracci vd., 2012).

STAR (Steroidogenic Acute Regulatory) geninin kodladığı protein pregnenolon içinde kolesterolün korunmasını artırarak steroid hormonların sentezinin düzenlenmesinde rol oynar. Bu süreç teka hücrelerinde gerçekleşir. Bu genin mutasyonları lipoid konjenital adrenal hiperplaziye yol açar. Kolesterol birikimi ve ovaryan hasar sonucu POY oluşur (Bhangoo, Buyuk, Oktay, & Ten, 2007).

CYP17A1 (Cytochrome P450, family 17, subfamily A, Polypeptide 1) geni dehydroepiandrosteron ve androstenedionu progesterone ve pregnenolona dönüştüren cytochrome P450 süper ailesinin bir enzimini kodlar. Eksikliğinde 17-alpha hydroxylase eksikliğinden dolayı konjenital adrenal hyperplasia oluşur, foliküller yeterince büyüyemediği için primer amenore ortaya çıkar. Yardımcı üreme teknikleri (IVF ve in vitro steroidogenesis) ile oosit maturasyonu ve fertilizasyon mümkündür (Pellicer, Miro, Sampaio, Gomez, & Bonilla-Musoles, 1991).

CYP19A1 (Cytochrome P450, family 19, subfamily A, Polypeptide 1) geni enzyme aromatase enzimini kodlar. Bu enzim östrojenin androjene dönüşümü için gereklidir. Bu genin mutasyonlarında aromataz eksikliği sendromu oluşur. Folikülün olgunlaşma probleminden dolayı virilizasyon ve primer amenore ile karakterizedir. Ayrıca polimorfizmlerinde dolaşımdaki östrojen düzeylerin etkileyen *CYP19A1* ve *ESR1* genleri arasında epistazis tespit edilmiştir. Koreli POY olgularında Bu etkileşim ve *FSHR* ve *CYP19A1* arasındaki epistazis östrojen üretiminin düzenlenmesinde etkilidir (Kim, Pyun, Cha, Ko, & Kwack, 2011).

eIF2B (Eukaryotic initiation factors 2B) geninin mutasyonlarında, özellikle *EIF2B2*, *EIF2B4* ve *EIF2B5*, GTP için eIF2'ye bağlı GDP'nin değişimini katalizler, ovariolökodistrofi (beyinde beyaz cevherin dejenerasyonu ve POY), fakat yalnızca POY olgularında bu mutasyon gözlenmemiştir (Fogli vd., 2004).

NOG geni (Noggin) overde ekspre olur ve ürünü noggin proteindir. BMP proteinlerine antogonist etkilidir ve over fonksiyonu için gereklidir. Mutasyonları Proksimal falanks eklemlerinin ankilozu (sympalangism) ile ilişkilendirilmiştir. Bu genin haploinsufficiency olması nedeni ile yakın falankslar arasında bulunan eklemlerin füzyonu ile karakterizedir. Bu genin mutasyonlarında BMP'lerin bozulmuş fonksiyonundan dolayı POY'a genetik yatkınlığın arttığı ileri sürülmüştür (Kosaki vd., 2004).

ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) geni hücre metabolizması ve siklunun kontrol edilmesinde ve DNA hasarının algılanmasında rol oynayan protein kinaz üyesini kodlar. Mutasyonlarında ataxia telangiectasia hastalığı ortaya çıkar. Beyin kontrol noktalarının dejenerasyonu ile ortaya çıkan resesif bir hastalıktır. Konuşma bozuklukları ve infertilite ortak bulgulardır. Bazı hastalarda hiçbir olgunlaşmamış olgun oositi olamayan ovaryan hipoplazi gözlenmiştir. Ayrıca knockout farelerde yapılan çalışmalarda folikül gözlenmemiştir (Persani vd., 2010)

POLG (Polymerase (DNA Directed) Gamma) geni mitokondriyal DNA replikasyonundan sorumlu mitokondriyal DNA γ polimeraz kodlar. Mutasyonlarında ptosis göz hareketlerinin kısıtlılığı ile karakterize ilerleyici dış ophthalmoplegia (göz felci) görülür. Mitokondriyal disfonksiyon nedeni ile POY gelişir (Luoma vd., 2004).

PMM1 (Phosphomannomutase 1) geni karbonhidrat yetersizliği olarak adlandırılan metabolik anomali ile ilişkilidir. mannose-6-phosphate birimi sonucu POY oluşumu gerçekleşir (Cox & Liu, 2014).

BMPR1B (Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B) geninin homozigot mutasyonlarında, akromezomelikkondrodisplazi tanımlanmıştır. Bu kalıtsal hastalık *GDF5* (Growth Differentiation Factor 5) mutasyonlarından kaynaklanan iskelet anomalileri ile karakterizedir. Ayrıca genital anomaliler ve amenore (Demirhan syndrome) de tanımlanmış ancak bu anomaliler sadece *GDF5* mutasyonlarında gözlenmemiştir. *GDF5* proteini *BMPR1B* reseptörüne yüksek afinite ile bağlanmaktadır, bu şekilde hastalığın gelişimine katkıda bulunduğu inanılmaktadır (Demirhan vd., 2005).

Ovulasyonla ilişkili bir hormone olan Aktivin A, germ hücrelerinin çoğalması ve canlılığını sürdürmesinde rol alır. Aktivin hormonun reseptörü olan *ACVR2* ile geni arasında epistatik ilişki tespit edilmiştir. *ADAMTS* genleri, fertilizasyondan doğuma kadar tüm gelişim basamaklarında rol alan, kadın üreme sistemi hastalıklarının patofizyolojisinde önemi giderek artan bir gen ailesidir (Pyun, Kim, & Kwack, 2015).

Tiroid disfonksiyonlarında menstrual bozukluklarında görülen infertiliter ile ilgili yapılan çalışmada POY gelişmesinin tiroid stimüle edici hormon (TSHB) ile *ADAMTS16* geni arasındaki epistatik ilişki sonucunda olduğu bildirilmiştir (Pyun, Kim, Cha, & Kwack, 2013).

Perrault Sendromu 46,XX gonodal disgenezi ve konjenital işitme kaybıyla karakterize bir hastalıktır ve genetik nedeni bilinmemektedir. Connexin gen ailesi işitme kaybı ile ilişkilendirilmiştir. *GJA4* (connexin 4) geni knockout farelerde antral aşamaya ulaşmış foliküllerin büyümesi durduğu için bu gen POY için bir başka aday gendir (Simon, Goodenough, Li, & Paul, 1997).

Bazı çalışmalarda POY Bloom syndrome, Werner syndrome, Rothmund-Thomson syndrome, Fanconi anemia, Nijmegen syndrome, Martsolf syndrome ve Cockayne syndrome ile de ilişkilendirilmiştir (Simpson, 2008).

b-) Sendromik olmayan POY ile ilişkili genler: İzole POY ile ilişkilendirilmiş pek çok aday gen bulunmaktadır. Bunlardan bazıları: *INHA*, *GDF9*, *TGFBR3*, *NOBOX*, *NANOS3*, *FIGL α* , *FOXO1*, *FOXO3*, *ESR1*, *WT1*, *PTEN*, *CDKN1B*, *CITED2*, *SF1*, *WNT4*, *DMC1*, *HFM* ve *MSH5* genleridir.

INHA (Inhibin, alpha) geni inhibin α subunitini kodlar. Gonadotropinlerin salgılanmasında down-regüle edicidir ve TGF- β super ailesine aittir. POY olgularında yapılan çalışmalarda New Zelenda'da 38 hastanın %7'sinde, 133 Hintli hastanın %10.5'inde, 157 İtalyan hastanın %4.5'inde mutasyon saptanmış ve güçlü bir aday gen olarak kabul edilmiştir (Chand, Harrison, & Shelling, 2010).

GDF9 (Growth Differentiation Factor 9) geni TGF- β süper ailesinin bir üyesi olan protein kodlar ve BMP15 ile heterodimer yapısıyla hareket edebilir. Oositlerden eksprese olur. Hindistan, Çin ve beyaz ırk POY olgularında mutasyonları tespit edildiği için güçlü bir aday gendir. Hindistan'da 127 POY olgusunun 5'inde missense mutasyon (A199C ve G646A) , Çin'de 100 POY olgusunda pro-domain mutasyon (Thr238Ala) bulunmuş, 96 kontrol grubunda rastlanmamıştır (Simpson, 2008).

TGFBR3 (Transforming Growth Factor, Beta Receptor III) geni transforming growth factor betatype III or β -glucan receptorü kodlar ve TGF betaya bağlanarak sinyal reseptörüne sunulmasında görev alır.

Germline mutasyonlarında inhibin aracılı FSH'nın düzenlenmesinin kaybına neden olur. Hindistan'da 196 POY olgusu olan kadında yapılan çalışmada bu genin 46 ekzonik, 16 intronik varyant mutasyon saptanmış ve 200 kontrol olgusundaki oranlara göre anlamlı bulunmuştur (Dixit vd., 2006).

NOBOX (newborn ovary homeobox protein) geni oosite özel genleri düzenleyen ve metafaz II aşamasına kadar ifade edilen bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Knockout farelerde oogenez gerçekleşmemiştir. Yaptıkları çalışmada 96 POY olgusunda kontrol grubunda olmayan R355H mutasyonu tespit etmişlerdir. Bu çalışma ile 7q35 bölgesinde bulunan *NOBOX* geni ile ilişkili fenotip OMIM'de POF5 olarak tanımlanmaktadır (Qin vd., 2007). Fransa'da 178 POY olgusunun %6,2'sinde mutasyon tespit edilirken Çin, Japon ve beyaz ırkta gözlenmemiştir (Bouilly, Bachelot, Broutin, Touraine, & Binart, 2011) .

NANOS3 (Nanos homolog 3 (Drosophila)) geni RNA-binding protein kodlar. Knockout farelerde germ hücre eksikliği gözlenmiştir. 80 Çinli 88 beyaz ırk POY olgusunda mutasyonları tanımlanmıştır (Simpson, 2008).

FIGLa (Factor In the Germline alpha) geni oogenez için önemlidir. Oosit spesifik transcription factor kodlar. Bu transkripsiyon faktörü folikülogenez ve zona pellusida oluşumu için gerekli genlerin düzenlenmesinde görevlidir. Knockout farelerde primordial folikül formları gözlenmemiştir. Çin'de 100 olguda mutasyon tanımlanırken 340 kontrolde tanımlanmamıştır. Bu çalışma ile 2p13.3 bölgesinde bulunan *FIGLa* geni ile ilişkili fenotip OMIM'de POF6 olarak tanımlanmaktadır (H. Zhao vd., 2008). Hindistan'da 219 POY olgusu ve 230 kontrol grubunda yapılan mutasyon çalışmasında sadece POY olgularında anlamlı oranda tanımlanırken kontrol grubunda saptanmayan c.252C→T ve c. c.427→C varyantları bildirilmiştir (Tosh, Rani, Murty, Deenadayal, & Grover, 2015).

FOXO1 (Forkhead box O1) ve *FOXO3* (Forkhead box O3) genleri forkhead gen ailesine aittir. Knockout farelerde folikül olgunlaşması erken aktive olur ve infertiliteye neden olur. 90 POY olgusunun birinde *FOXO1* ve ikisinde *FOXO3* mutasyonu tanımlanmıştır. Ancak çalışmalar yeterli değildir (Watkins vd., 2006).

ESR1 (Estrogen Receptor 1) geni, *HK3* (Hexokinase 3) ve *BRSK1* (BR Serine/ threonine Kinase 1) genleri ile birlikte, POY ve doğal menopoz ile ilişkilendirilmiştir. Çin, Kore, Alman popülasyonlarında variant mutasyonları tanımlanmıştır (Qin vd., 2014). Çin'de *ESR1* gen polimorfizminin POY için risk faktörü olarak değerlendirilebileceği öne sürülmüştür (Liu, Tan, Cui, Liu, & Wu, 2013).

WT1 (Wilms tumor 1) geni granüloza hücrelerinde ekspre edilen transkripsiyon faktörü kodlar. Knockout farelerde POY tanımlanmış ve mutasyonlarının *FSHR*, aromatase ve the 3 β -HSD (3 β - hydroxysteroid dehydrogenase) ekspresyonunu inhibe ederek granüloza hücre polaritesinde hatalara ve sonuçta POY'a neden olduğu gözlenmiştir (Gao vd., 2013).

PTEN (Phosphatase And Tensin Homolog) geni tümör suppressor protein kodlar. Exon 7'de 20 olguda tek nüleotid polimorfizmi bildirilmiştir (Shimizu vd., 2009).

CDKN1B (Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 1B (P27, Kip1)) geninin farelerde yapılan çalışmalarda ovaryan gelişmede önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Bu çalışmadan yola çıkarak yapılan Tunus'ta bir çalışmada bu genin sekans analizinde 76 POY olgusunun %87,4'ünde, 111 kontrol grubun %81'inde tek nüleotid polimorfizmi değerlendirilmiştir (Ojeda vd., 2011).

CITED2 (Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy- terminal domain, 2) geni knockout farelerde gonodal gelişim anomalileri; Tunus ve Avustralya'da yapılan çalışmalarda POY olgularında ise mutasyonları saptanmıştır (Fonseca, Ojeda, vd., 2012).

SF1 (Splicing Factor 1) geni östradiol düzeylerinin düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir (Chen vd., 2011).

WNT4 (Wingless-type MMTV Integration Site Family, Member 4) geni kadın cinsiyetinin belirlenmesi, ovaryan farklılaşma, bakım ve sağ kalımında önemli rol oynar (Chen vd., 2011).

Afrika'da POY olgularında yapılan bir çalışmada *DMC1* (DNA Meiotic Recombinase 1) geni, Caucasian POY olgularında yapılan bir çalışmada *MSH5* (MutS Homolog 5) geni mutasyonları saptanmıştır (Mandon-Pépin vd., 2008).

POY olan Çinli iki kız kardeşte *HFM1* (Hemifacial Microsomia) mayoz ile ilişkili gende kompaund heterozigotluk saptanmıştır. Kız kardeşlerin etkilenmemiş ebeveynlerinde yapılan taramada her bir mutasyonu taşıdıkları gözlenmiştir. Bunun üzerine 69 POY olgusunun taranmasında aynı mutasyon gözlenmiş ve 1p22.2 bölgesinde bulunan bu *HFM1* geni ile ilişkili fenotip OMIM'de POF 9 olarak tanımlanmıştır (J.-L. Wang vd., 2014).

POY olgularında diğer aday gen kromozom 9'da lokalize *NR5A1* (Nuclear receptor Subfamily 5, Group A, Member 1) dir. *NR5A* cinsiyet gelişimi ve üreme ile ilgili birçok genin transkripsiyonun düzenlenmesinde nükleer reseptör rolü oynamaktadır.

2.3 –Genomik Çalışmalar ve POY

Mikroskobik ve bilinen mutasyon analizleri ile etiyolojinin tanımlanamadığı, özellikle idiyopatik ailesel POY olgularında genom çapında çalışmalar, aday kromozomal lokus ve aday gen belirlenebilmesine olanak sağlamaktadır. POY'un genetik temelli olması genomik çalışmaların gerçekleşmesinde etkilidir. Aday genlerin belirlenmesi için, GWAS (Genom Wide Association Studies) ve bağlantı analizleri olmak üzere iki strateji vardır.

2.3.1 Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ve bağlantı analizleri

GWAS analizlerinde, etkilenen bireylerdeki polimorfizmlerin (SNP veya CNVs) kontrol grubu ile karşılaştırılarak ve farklı çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile değerlendirilerek aday genler çıkartılmaktadır.

Bağlantı analizleri ise ilgili bölgede genetik bir belirtecin (SNPs veya mikrosatellitler) kalıtsal takibine dayalı metotlardır. Bu metodun uygulanması hasta sayısının yetersizliği sebebi ile zordur.

POY ile ilgili ilk GWAS, 2008 yılında Kang ve arkadaşları tarafından Koreli POY olgularında yapılmıştır. Bu çalışmada kromozom 7p14 bölgesine lokalize parathyroid hormone responsive-B1 (*PTHB1*) geninde POY'a yatkınlıktan sorumlu olabilecek 'GAAAG' hablotip polimorfizm tespit etmişlerdir. Hayvan model temelli genom çalışmalarında *BDNF*, *CXCL12*, *LHR*, *USP9X* ve *TAF4B* genlerinde POY'dan sorumlu olabilecek SNP'ler gözlemlenmiştir (Stigliani, Anserini, Nicoletti, Di Luca, & Sozzi, 2013).

İlk bağlantı analizi ise yine 2008 yılında yedi etkilenen kadının olduğu Hollandalı bir ailede yapılmıştır. 50K SNP array kullanılarak yapılan çalışmada kromozom 5q14.1-q15 bölgesinde POY için aday genler olabileceği bildirilmiştir (Oldenburg vd., 2008). Exom sekansı kullanılarak yapılan çalışmada etkilenen dokuz kadında *eIF4ENIF1* mutasyonu bulunmuş, 38 kontrol grubunda bulunmamıştır (Kasippillai vd., 2013).

POY olan bir aile çalışmasında tam exome dizi analizi yöntemi kullanılarak, 7q22.1 kromozomal bölgesi üzerinde *STAG3*'de bir çerçeve kayması mutasyonunu indükleyen homozigot 1bp delesyonu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile 7q22.1 bölgesinde bulunan *STAG3* geni ile ilişkili fenotip OMIM'de POF8 olarak tanımlanmaktadır. *STAG3* kohezinin halkasının bir mayoz-spesifik alt birimini kodlar. *STAG3* yoksun dişi fareler infertildir ve oositleri fetal profaz1'de arreste uğrar, yaşamlarının ilk birinci haftasında oosit depleksiyonuna yol açar (Caburet vd., 2014).

POY'dan etkilenen Orta Doğu ailesinde, kromozom 7 üzerinde p21.1-15.3 ve q21.3-22.2'de olmak üzere iki bölge belirlenmiştir. Kromozom 7q21.3-22.3 üzerindeki bölüm, steroid ile alakası olan *DLX5* ve *DLX6* genleri içerir ve hayvan modellerinde oogenezin ve dişi doğurganlık için gerekli olduğu bildirilmiştir (Caburet vd., 2012).

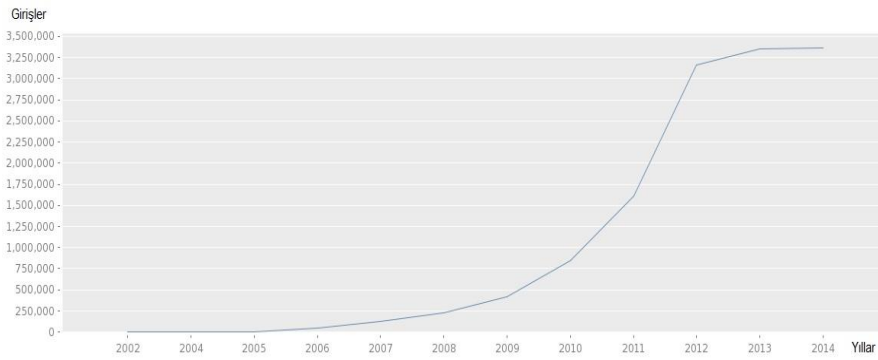
Ayrıca, son çalışmalar oosit olgunlaşması ve folikülogenez için mikro RNA'ların (miRNA'ların) düzenleyici fonksiyonu olduğunu ve fertilitede ve POY olgularında farklı miRNA ekspresyon profilleri gözlemlendiği bildirilmiştir (Yang vd., 2012). Koreli POY olgularında yapılan yeni bir çalışma XPO5 rs2257082 T varyant aleli kontrollerde daha az bildirilmiş ve POY ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Rah vd., 2013)

Özellikle Turner Sendromu ve *FMR1* premutasyon taşıyıcılarının oranı %3-15 arasındadır. Olgulardaki *FMR2* mutasyonlarının oranı %1.5, *PGRMC1* ve *BMP15* mutasyonlarının oranı %1.5-12, *NR5A1*, *FOXL2*, *INHA* mutasyonlarının oranı %4.5-10.5 (Yeni Zelanda Hindistan, İtalya), *GDF9*, *NOBOX* mutasyonlarının oranı %5,2 (Fransız) bildirilmiştir.

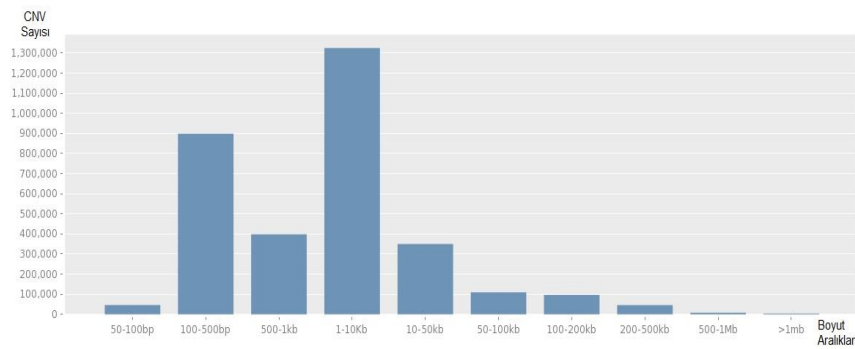
2.3.2 Kopya sayısı değişimleri

İnsan genomunda yer alan ve referans genom ile karşılaştırıldığında, 1000 baz çiftinden (1kb) daha büyük yapısal değişiklikler "kopya sayısı farklılıkları" (CNVs) olarak adlandırılır. Bireyler arasındaki farklılıkların

genomik temellerinin anlaşılmasında, gelişen teknoloji ile beraber insan genom projesi ve sonrasında gerçekleştirilen genom araştırmalarının büyük katkısı olmuştur. Bu değişimlerin tek bazlık varyasyonları mutasyon (%1'den az) veya "tek nükleotid polimorfizmleri" (SNPs) olarak adlandırılır. Kopya sayısı değişikliklerinin bulunduğu veri tabanı olan Database of Genomic Variations (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>)'a göre son yıllarda tanımlanan CNV'lerin sayısı artmış (Şekil 2.6) ve 1 kb'dan daha küçük 50bp uzunluğunda CNV'ler de tanımlanmıştır (Şekil 2.7). Duchenne kas distrofisi, fenilketonüri, kistik fibrozis, talasemi, orak hücreli anemi, hemofili, Huntington gibi hastalıklar tek gene bağlı Mendel tipi hastalıklardır. Kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser, obezite, astım, nörolojik ve mental bozukluklar vb. gibi toplumun daha büyük bir kısmını etkileyen hastalıklar ise kompleks kalıtım gösteren hastalıklardır. Kompleks yapıdaki hastalıklarda tek bir genin saf katkısı yerine, birçok genin farklı oranlarda katkısı, çevre ve yaş faktörleri vardır ve mutasyonlardan daha çok penetransları düşük olan polimorfik farklılıklar görülür.



Şekil 2.6: CNV varyasyonlarındaki artış ("Database of Genomic Variants," 2014b)



Şekil 2.7: CNV'lerin boyut dağılımları ("Database of Genomic Variants," 2014b)

Kompleks hastalıkların mendel kalıtım gösteren ailevi türü nispeten erken başlangıçlı türüdür ve kompleks hastalıkların %5-10'unu oluşturur. Alzheimer, Parkinson, ALS ve meme kanseri gibi kompleks hastalıklarda tanımlanan genler genetiğinin tanımlanmasına önemli katkılar sağlamıştır.

Kompleks ya da poligenik hastalıklarda genetik yapısının belirlenmesi, hastalığın fenotipinin açıklanmasına katkısının yanı sıra hastalıklara yatkınlığın, hastalık sürecinin ve tedaviye yanıtın belirlenmesine de katkı sağlar.

Bireyler arasındaki genom çeşitliliğini Tek Nükleotid Polimorfizmleri (Single Nucleotide Polymorphisms: SNP) ve Kopya Sayısı Farklılıkları (Copy Number Variations: CNV) ile açıklanabilir. CNV'ler SNP'lerden daha fazla nükleotidi kapsarlar ve boyutları ile farklılık gösterirler.

CNV mutasyonları, Mendel tipi ve kompleks hastalıkların her ikisinde de gözlenmektedir. Birçok gen ve gen anlatımını düzenleyen bölgelerin bu CNV'lerden etkilenmesi ile gen dozajını ve anlatımının olumsuz etkilenmesi söz konusu olabilmekle beraber, genomun bazı bölgelerindeki CNV'ler belirgin fenotipe yol açmayabilir. Dolayısıyla hastalık oluşmasına etkileri tek başlarına olabildiği gibi çevresel ya da diğer genetik faktörlerin etkisi ile olmaktadır. Bir CNV'nin patojenik yönde değerlendirilebilmesi için etkilenmiş ebeveynde aynı CNV'nin bulunması, değişim *de novo* ise klinik bulguların varlığı ve mevcut CNV'nin hastanın kliniği ile ilişkili olma potansiyeli, polimorfik varyant ile uyumlu olmaması, değişimin büyük olması, içerdiği genlerin sayısının çokluğu, literatürde klinik bir fenotip ile ilişkilendirilmiş olması, duplikasyondan ziyade delesyon olması faktörleri göz önünde bulundurulmalıdır.

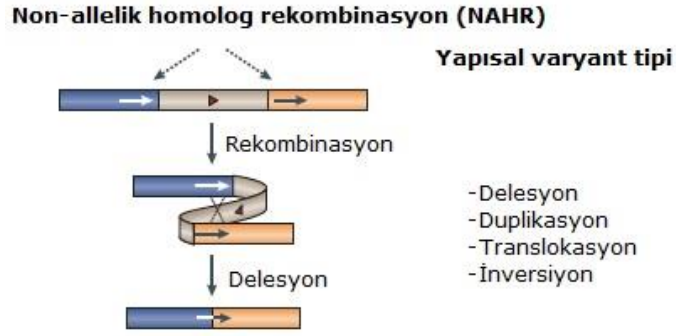
Bireyler arasında farklılık gösterebilen CNV'ler etkilerini doğrudan gen dozajı veya daha geniş çapta pozisyon etkisi ile gen ifadesinin kontrolünü değiştirerek göstermektedirler. CNV'ler bir genin tamamını, gen parçalarını, çok sayıda geni, regülatör elementleri içerebilir veya gen dışı bölgelerde bulunabilir.

2.3.2.1 Kopya sayısı varyantlarının oluş mekanizmaları

İlgili gen bölgesinin yakınındaki genomik dizi CNV'nin nasıl oluştuğuna dair ipuçları vermektedir. Sıklıkla bir CNV segmental duplikasyon, düşük kopyalı tekrarlar, Alu veya LINE gibi hemen hemen aynı dizi bloklarıyla çevrilidir. Rekombinasyon sırasında aynı genom dizileri DNA iplikçilerinin hatalı dizilimine neden olur (Lee & Scherer, 2010).

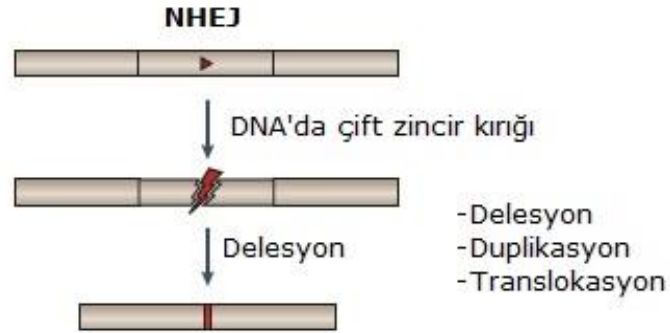
NAHR (Nonallelic Homolog Recombination): Çeşitliliğin sağlanması amacıyla homolog kromozomların kardeş olmayan kromatitleri arasında genetik materyal değişimi olmaktadır ve rekombinasyona bağlı bir mekanizmadır. Allelik olmayan kromozom bölgelerinin değişimi yapısal yeniden düzenlenmelere neden olur. Genomun bazı bölgeleri tekrarlayan DNA dizisi varlığı nedeniyle çift zincir kırıkları için daha hassastır. 50-100 kb büyüklüğünde düşük kopya tekrarlarının (LCRs) aracılığı ile allelik olmayan homolog bölgeler arasında gerçekleşen rekombinasyona sekonder olarak delesyon, duplikasyon, inversiyon, translokasyon, izokromozom, marker kromozom, yapısal polimorfizm gibi yeniden

düzenlenmeler gerçekleşir (Şekil 2.8). İlk olarak Charcot–Marie–Tooth Hastalığı Tip 1A'ya (CMT1A) neden olan duplikasyonlar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lee & Scherer, 2010).



Şekil 2.8:Non-allelik homolog rekombinasyon (Weischenfeldt, Symmons, Spitz, & Korbel, 2013)

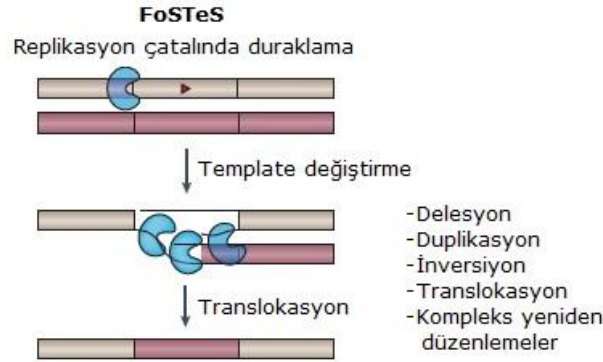
NHEJ (Nonhomolog End Joining Mechanism): DNA'daki çift iplik kırılmalarını tamir eden ve kırılma uçlarını homolog olmaksızın doğrudan bağlayan basit bağlı bir mekanizmadır (Şekil 2.9). DNA'da bazı bölgeler "hot spot", kırılmalara daha yatkındırlar. Translokasyondaki kırık bölgeleri homoloji göstermemekte ve çift zincir kırıkların oluşumuna neden olan, nükleazlara duyarlı, hatalı sekonder yapının oluşumundan sorumlu, stabil olmayan AT zengin palindromik diziler içermektedir.



Şekil 2.9:Homolog olmayan serbest uçların bağlanması (Weischenfeldt vd., 2013)

FoSTeS (Fork Stalling and Template Switching): Mitoz sırasında olduğu tahmin edilen DNA rekombinasyonuna bağımlı bir mekanizmadır. DNA replikasyonu sırasında kesintili zincirin replikasyon çatalından kesintisiz zincirin replikasyon çatalına taşınması ile gelişir (Şekil 2.10). Sırasıyla replikasyon durur, kesintili DNA zinciri çözülür kısa homolog bölgelerin etkisiyle aynı veya başka kromozomun farklı bir yerine bağlanmasıyla replikasyon yeniden başlar. Bunun sonucunda da karışık yeniden düzenlemeler oluşabilir. İlk olarak Pelizaeus–Merzbacher hastalığında *PLP1* geninin, Potocki-Lupski'de 17p11.2 bölgesinin ve daha çok erkeklerde gelişme geriliği ve mental retardasyonla ilişkili *MECP2*

(metil-CpG bağlayan protein 2) genindeki amplifikasyonlarla ilişkilendirilmiştir (Lee & Scherer, 2010).



Şekil 2.10:FoSTeS (Weischenfeldt vd., 2013)

2.3.3 Array karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH)

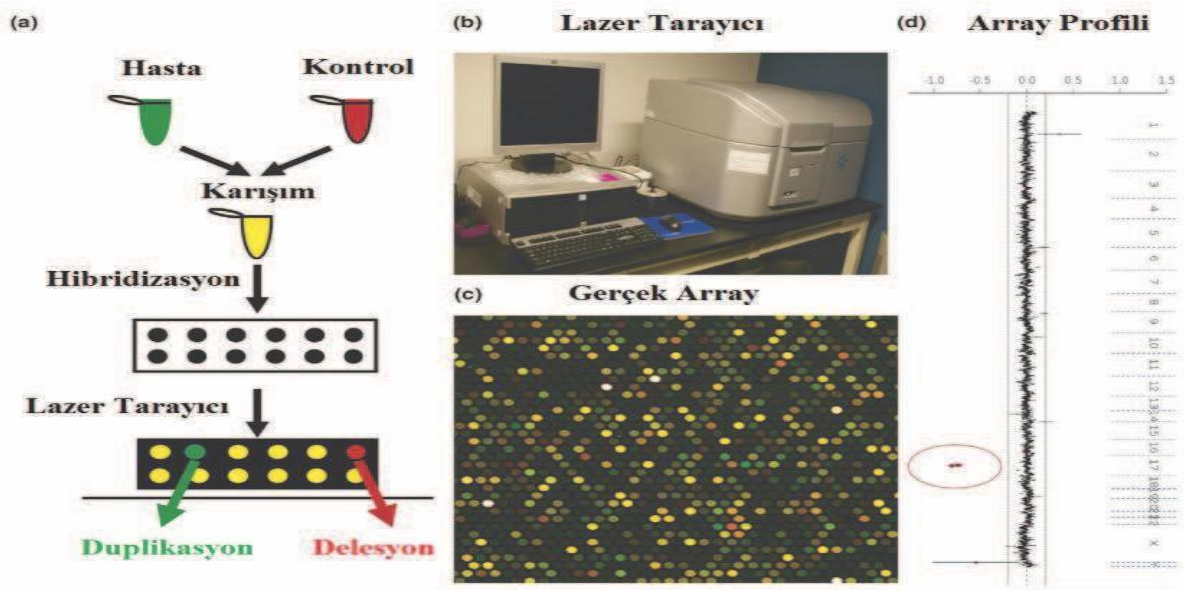
Konvansiyonel sitogenetik analiz genetik temeli olduğu bilinen; konjenital anomaliler, dismorfizm, gelişim geriliği, düşükler ve genetik sendromların tanısında rutin olarak uygulanmaktadır. Bu hastalıkların sebepleri arasında kromozomal anöplidiler, yapısal aberasyonlar (delesyon, duplikasyon, inversiyon, translokasyon ve marker kromozom) bulunmaktadır. Tanı amaçlı bu tekniğin kullanımı ile dengeli ve dengesiz yapısal ve sayısal kromozom anomalilerini tanımlamaktadır. Bununla birlikte, rutin karyotip analizi küçük (<5Mb) kromozom yeniden düzenlenmelerini tespit etmede sınırlı kalmaktadır. FISH (Floresan İn Situ Hibridizasyon) yönteminin gelişmesi tanısal çözünürlüğü artırmıştır. Konvansiyonel sitogenetik analizde saptanamayan <3Mb değişikliklerin saptanmasında rutin olarak uygulanmaktadır. FISH analizinde, floresan ile işaretli DNA problrarı interfaz hücrelerine veya metafaz kromozomlarına hibridize olarak spesifik genomik segmentlerin varlığını, konumunu ve sayısını tespit etmektedir. Bununla birlikte FISH yöntemi bilinmeyen genomik dengesizlikler için tüm genomda tarama yapamamaktadır.

aCGH tekniği genomik CNV'lerin yüksek çözünürlükte tüm genom boyunca taranabilmesine olanak sağlayan 50-70 kb büyüklüğünde oligonükleotid problrarın kullanıldığı moleküler karyotipleme tekniğidir (Solinas-Toldo vd., 1997). İlk olarak Solinas-Toldo ve arkadaşları 1996 yılında hedef diziyi cam slayt üzerine immobilize ederek bu tekniğin temelini atmışlardır. aCGH iki farklı floresan boya ile etiketlenmiş DNA'nın cam bir slaytta hibridizasyonuna dayanır. Bu sayede çok sayıda farklı genomik lokusun DNA kopya sayısı kazanç ve kayıplarının karşılaştırmalı sorgulanması mümkün olmaktadır.

CGH ilk olarak tümör sitogenetiğinde moleküler araç olarak geliştirildi (Kallioniemi vd., 1992). Bu teknik ile hastaya ve referansa DNA örnekleri farklı floresan boylarla etiketlenir ve cam lamlara yayılmış metafaz

üzerinde hibridize edilir. Sinyallerin birbirine oranı floresan mikroskopta incelenerek, farklı hibridizasyon sinyalleri ile 3-10 Mb çözünürlükte tespit edilebilmekte ve dengesiz kromozom yeniden düzenlenmeleri saptanabilmektedir (Kirchhoff vd., 1999). Metafaz kromozomu üzerinde her iki floresan rengin oluşturduğu dengenin bozulması ile delesyon/duplikasyon tanısı konulabilmektedir. Metafaz CGH kullanışlı bir tanı aracı olmasına rağmen önceden tanı almamış gelişim geriliği ve konjenital anomalileri olan vakaların yaklaşık %10'una bir açıklama getirebilmektedir. Metafaz kromozomlarının düşük çözünürlüğü, perisentromerik ve telomere bölgelerindeki hassasiyetin yetersiz olması, analiz ve uygulamadaki zorluklar ile teknik güçlükler bu uygulamanın yaygın kullanımına engel olmaktadır (Kirchhoff, Rose, & Lundsteen, 2001). Metafaz kromozomlarının ayırık metal uçlar veya cam kapillerler kullanarak robot yardımı ile hareket etmeyecek şekilde cam lam üzerine yerleştirilmiş hedef DNA'lar ile değiştirilmesi, çözünürlüğü önemli derecede artırmış ve analiz sürecini kolaylaştırmıştır.

aCGH metodu genom boyunca serbest bir şekilde konumlandırılmış oligonükleotidler ile cam bir slaytta referans bir kontrol ile karşılaştırılması temeline dayanır. aCGH metodunda, eşit miktarda etiketli genomik DNA ve referans örneği DNA hedeflerini içeren array üzerine bir araya getirilerek hibridize edilir. Hastalara ve kontrole ait genomik DNA'lar Cyanine 3 (Cy3) ve Cyanine 5 (Cy5) ile farklı farklı etiketlenmektedir. Tekrarlayan dizilerin hibridizasyonu cot-1 DNA eklenerek engellenebilir. Lamlar mikroarray tarayıcısı kullanılarak imaj dosyalarına çevrilir. Spot yoğunlukları ölçülür ve imaj dosyaları özellik çıkartma yazılımları kullanılarak logaritmik oranları metin dosyaları (.txt) şeklinde elde edilir ve kopya sayısı analizi için yazılımın içine aktarılır (Lu vd., 2007). (Şekil 2.11)



Şekil 2.11: aCGH işlemlerinin genel özeti - Shinawi ve Cheung'tan (Shinawi & Cheung, 2008) alınmıştır.

Farklı aCGH platformlarının genomik çözünürlüğü DNA problemlerinin yerleşimi ve uzunluğu ile belirlenmektedir. aCGH platformlarının çoğu anöploidileri, iyi tanımlanmış mikrodelyasyon veya mikroduplikasyon sendromlarını ve subtelomerik veya diğer dengesiz kromozomal yeniden düzenlenmeleri tespit edebilecek şekilde tasarlanmıştır.

Hedef problemlerin megabaz başına yaklaşık bir klon büyüklüğünden 100 kb başına bir klon büyüklüğüne olan, eşit aralıklarla yerleştirilen tüm genom aCGH platformları da vardır (Veltman & de Vries, 2006). Ticari olarak mevcut olan tüm genom oligonükleotid array kapasitesi 6 kb başına bir probdan 70 kb başına bir proba kadar değişmektedir (Shaikh, 2007).

3- GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 -Hasta Grubu

Çalışmamızda Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Polikliniği'ne Ağustos 2013-Aralık 2014 tarihleri arasında başvuran, klinik ve laboratuvar verileri ile POY tanısı alan olgularda genomik kopya değişimlerini araştırmak amacıyla a-CGH analizleri gerçekleştirilmiştir.

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Polikliniği'nde POY tanısı alan olgular, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Polikliniği'nde sendromik / non-sendromik değerlendirmeden geçirilmişlerdir. Klinik değerlendirme sonrası olgulardan alınan heparinize periferik kanda konvansiyonel sitogenetik analizler Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Sitogenetik seksiyonunda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya non-sendromik POY tanısı olan ve normal kromozom kuruluşuna sahip olan toplam 55 olgu dâhil edilmiştir. Olguların yaş aralığı 19-39 arasındadır.

Frajil X premutasyon ve a-CGH analizleri için olgulardan alınan EDTA'lı periferik kan örnekleri kullanılarak genomik DNA ekstrasyonları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamız için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 21.08.2013 tarih ve 2013/16 sayılı onay alınmıştır. Araştırmaya dâhil edilme kriterlerine uyan olgulara çalışma amaç ve aşamaları anlatılmış ve her olgudan onam formu alınmıştır.

3.2 - Gereçler

3.2.1 Kullanılan aletler

- İnsan CGH Mikroarray Kiti 8x60K (Agilent G4450A SurePrint G3)
- Mikroarray Tarayıcısı (Agilent p/n G2565CA)
- Hibridizasyon Haznesi (leke tutmayan özellikte, Agilent p/n G2534A)
- Hibridizasyon Haznesi Contalı Lamı (Agilent p/n G2534-60014)
- Hibridizasyon Fırını (Agilent p/n G2545A)
- Hybridization Fırını Rotatoru (Agilent p/n G2530-60029)
- Ozon bariyer lam kapağı (Agilent p/n G2505-60550)
- Manyetik Karıştırıcı Çubuk (Corning p/n 401435)
- Isıtma Özellikli Manyetik Karıştırıcı Plaka (Corning p/n 6795-410)
- Otomatik kapiller elektroforez cihazı (ABI 3130)
- Cam Tabak (1.5 L) (Borcam)
- Lam Yıkama Plakaları (250 ml) (Wheaton p/n 900200)
- Lam Tutucusu (Agilent G2505-60525)

- Pipet Takımı (Gilson)
- Jel Görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)
- Mikrosantrifüj (Albrecht vd., 2004)
- Isı döngüleyicisi (PE GenAmp PCR System 9700)
- Çeker Ocak (LaminAir)
- Su Banyosu (Nüve)
- Vorteks (Heidolph)
- Beher (500'lük)
- Derin dondurucu (Arçelik)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik)
- Buzdolabı (Arçelik)
- 1.5 ml'lik mikrofüj tüpleri (Ambion p/n AM1240)
- PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)
- Toplama tüpü (Qiagen)
- Spin kolonu (Qiagen)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000)
- Amicon Ultra-0.5,
- Ultracel-30 Membran,
- 30 kDa Filtresi (Milipore p/n UFC503096)

3.2.2 Kullanılan kimyasal maddeler

- DNA Ekstraksiyon Kiti (Qiagen p/n 69504)
- RNase A (100 mg/mL) (Qiagen p/n 19101)
- Proteinaz K solüsyonu (>600 mAU/mL) (Qiagen p/n 19131)
- İnsan gDNA'sı [Promega p/n G1521 (dişi) ve p/n G1471 (erkek)]
- Alu I (10 U/μL) (Promega p/n R6281)
- Rsa I (10 U/μL) (Promega p/n R6371)
- Agaroz (Scjarlou)
- Borik Asit (Albrecht vd., 2004)
- Etidyum Bromid (Albrecht vd., 2004)
- Moleküler Ağırlık Belirteci (Fermantas)
- 6X Jel yükleme tamponu (Albrecht vd., 2004)
- Genomik DNA Enzimatik Etiketleme Kiti (Agilent p/n 5190-0449)
- Nükleazdan arındırılmış su,
- Exo (-) Klenow,
- 5X Reaksiyon tamponu,
- Cyanine 5-dUTP,
- Cyanine 3-dUTP,
- 10X dNTP,
- Rasgele Primer
- 1 × TE (Tris Edta) (pH 8.0) (Promega p/n V6231)
- Asetonitril (%100, 1L) (Sigma p/n 271004)
- Oligo aCGH Yıkama Tamponu 1 ve 2 (Agilent p/n 5188-5226)
- Oligo aCGH Hibridizasyon Kiti (Agilent p/n 5188-5220)
- Human Cot-1 DNA (Agilent p/n 5190-3393)
- PBS (Fosfat Tampon Solüsyonu)
- Distile Su

- Etanol (%95-100) (Tekel)
- Fragile X Primers (Abbott)
- Gender Primers (Abbott)
- High GC PCR Buffer (Abbott)
- ROX 1000 Size Standart (Abbott)
- CleanUp Enzim Mix (Abbott)
- TR PCR Enzim Mix (Abbott)

3.3 - Yöntemler

3.3.1 Qiagen® ekstraksiyon kiti ile periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesi

Periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesinde Qiagen® Ekstraksiyon Kiti kullanılmıştır. DNA izolasyonu için üretici firmanın önerdiği protokol aynen uygulanmıştır:

- Su banyosunun sıcaklığı 56 °C'ye getirilmiştir.
- Kan örnekleri ve diğer malzemeler oda sıcaklığına getirilmiştir.
- 1,5 ml ependorf tüp strafora konulup üzerine protokol numarası yazılmıştır.
- 20 µl proteinaz K ependorf tüpünün dibine konmuştur.
- 100 µl hasta kan örneği ependorf tüpüne eklenmiştir.
- PBS tamponu çalkalanıp karıştırıldıktan sonra ependorf tüpüne 120 µl eklenmiştir.
- Bu karışım 15 sn. vortekslenmiştir.
- 56 °C'de 10 dk. inkübe edilmiştir.
- Çok kısa süreli santrifüj edilmiştir.
- 200 µl %96-100'lük etanol örneğe eklenip 15 sn. vortekslenmiştir.
- Filtreli tüpün kapağına protokol numarası yazılmıştır.
- Ependorf tüpündeki karışım dikkatlice filtreli tüpe aktarılmıştır.
- 8000 devir/dk'da 1 dk. santrifüjlenmiştir.
- Filtreli tüp yeni toplama tüpüne konulup, filtratlı tüp atılmıştır (Filtreli tüp tamamen boşalamadığı zaman tam devirde tekrar santrifüjlenmiştir) .
- 500 µl Buffer AW1 dikkatlice filtreli tüpe konulmuştur. 8000 devir/dk'da 1 dk. süreyle santrifüjlenmiştir.
- Filtreli tüp ikinci yeni toplama tüpüne konulup filtreli tüp atılmıştır.
- Filtreli tüpe 500 µl Buffer AW2 konulmuştur.
- 14.000 devir/dk'da 3 dk. santrifüj edilip filtratlı tüp atılmıştır.
- Filtreli tüp yeni Ependorf tüplerine aktarılıp tam devirde 1 dk. santrifüjlenmiş, ependorf tüpü atılmıştır.
- Filtreli tüp yeni ependorf tüpüne aktarılıp üzerine 200 µl Buffer A eklenmiştir.
- Oda sıcaklığında 5 dk. bekletilip 8000 devir/dk'da 1 dk. santrifüjlenmiştir.
- Filtreli tüp atılıp gDNA içeren ependorf tüpü -20 °C'ye kaldırılmıştır.

3.3.2 Genomik DNA'nın niceliksel ve niteliksel analizi

Oligo aCGH analizlerinin başarısı için gDNA'nın (genomik DNA) niceliksel ve niteliksel değerlendirilmesinin doğru biçimde yapılması son derece önemlidir. Yüksek kalitede gDNA; karbonhidratlar, proteinler ve organik çözücüler gibi atıklardan arınmış olmalı ve minimal degradasyona uğramış olmalıdır.

gDNA konsantrasyonunun ve saflığının değerlendirilmesi için NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spektrofotometresi kullanılmıştır:

-NanoDrop Program menüsünden Nükleik Asit Ölçümü seçildikten sonra örnek tipi DNA-50 olarak ayarlanmıştır.

-Cihazın ölçüm ayarını sıfırlamak için elüsyon tamponundan 1.5 µL kullanılmıştır.

- Her gDNA örneğinden 1.5 µL kullanılarak DNA konsantrasyonu ölçülmüştür. Ürün miktarları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Ürün } (\mu\text{g}) = \frac{\text{DNA konsantrasyonu (ng}/\mu\text{L}) \times \text{Örnek Hacmi } (\mu\text{L})}{1000 \text{ ng}/\mu\text{g}}$$

-Yüksek kalitedeki gDNA'nın A260/A280 oranı 1.8-2.0 arasında olması kontamine proteinlerin yokluğuna işaret etmektedir. Bu nedenle her örnekte A260/280 oranları kaydedilmiştir.

3.3.3 Genomik DNA enzimatik etiketleme kiti ile restriksiyon kesimi

a-CGH analizlerinde gDNA uzunluklarının homojen olması önemlidir. Bu nedenle, tüm gDNA örneklerinde enzimatik kesim işlemleri gerçekleştirilmiştir.

-Kit içerisinde bulunan C tamponu ve Asetillenmiş BSA (bovin serum albumin) (10 mg/µL)[Rsa I(10 U/ µL) enzimi ile birlikte -20 °C'de bulunmaktadır], karıştırıcıda kısa süre karıştırılmış, çöktürme işlemi için mikro santrifüjde hızlı döndürme gerçekleştirilmiştir.

-Isı hassasiyeti nedeniyle tüm aşamalar buz üzerinde gerçekleştirilmiş ve işlemler kısa sürede tamamlanarak tüpler -20 °C'ye kaldırılmışlardır.

Enzimatik kesim ve a-CGH analizleri için gerekli gDNA hacimleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Her reaksiyon için PCR tüpüne uygun miktarda gDNA eklenerek distile su ile tabloda belirtilen toplam hacme ulaşılmıştır.

Tablo 3.1: Mikroarray başına gerekli başlangıç gDNA miktarı

Mikroarray Formatı	Başlangıç gDNA miktarı (μg)	Restriksiyon Kesimli gDNA Hacmi (μL)
8x mikroarray	0.2 - 0.5	10.1

- Ana Kesim Karışımı (Dam vd., 2007) buzun üzerinde, Tablo 3.2'de belirtilen sıra ve miktarlarda hazırlanmıştır.

Tablo 3.2: Ana Kesim Karışımının (Dam vd., 2007) Hazırlanışı

Bileşen	Reaksiyon başına(μL)	16 reaksiyonluk (fazlası dâhil) (μL)
Distile Su	1	18
10X Buffer C	1.3	23.4
Asetillenmiş BSA(10 mg/ μL)	0.1	1.8
Alu I (10 U/ μL)	0.25	4.5
Rsa I (10 U/ μL)	0.25	4.5
Son Hacim	2.9	52.2

Çalışmada kullanılan mikroarray formatı 8 örneklilik olduğu için, 8 olgu gDNA'sı ve 8 referans gDNA'sının kesim işlemleri ayrı ayrı tüplerde gerçekleştirilmiştir.

-Her bir PCR tüpüne (toplamda 16 PCR tüpü) 2.9 μL AKK eklenmiştir. 10.1 μL hacme tamamlanan PCR tüplerine, 2.9 μL AKK eklenmesi ile toplam hacmi 13 μL 'ye ulaşan karışıma pipetaj yapılmıştır.

-Tüplere Tablo 3.3'de belirtilen ısı döngüleyicisi programı uygulanmıştır.

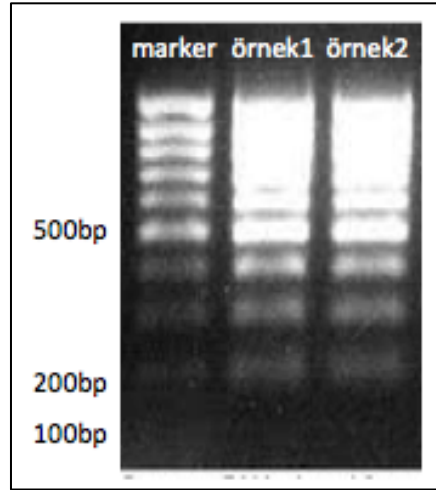
Tablo 3.3: Isı Döngüleyicisi Programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	37 °C	2 saat
2	65 °C	20 dakika
3	4 °C	∞

- Isı döngüleyicisi programı sonrasında her bir kesilmiş gDNA'dan 2 μL alınarak marker ile birlikte %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

-Etidyum Bromid ile boyanan jel, jel görüntüleme ve dökümantasyon sisteminde kesimin etkinliği açısından değerlendirilmiştir.

-Tüm örneklerde kesilen ürünlerin uzunluklarının 200-500 bp arasında olduğu jel analizi ile gözlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Enzimatik Kesim İşleminin Değerlendirilmesi (Marker: Moleküler Belirteç, örnek1 ve 2: Örnek protokolleri)

3.3.4 Genomik DNA'nın floresan işaretlemesi

a-CGH bir karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemi olduğu için olgu ve referans (normal) DNA örneklerinin hibridizasyonuna dayanmaktadır. Bu nedenle her iki DNA örneğinin farklı flor kromlarla işaretlenmesi gerekmektedir.

-İşaretleme öncesi, kesim işlemi tamamlanmış örneklerin her birinden 2 µg gDNA 1.5ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı. Olgu ve referans gDNA miktarlarının eşit olmasına dikkat edilmiştir.

-Tüpler, 1dk. süreyle 6.000g de döndürülerek tüp çeperleri ve kapaklarındaki karışım çöktürülmüştür.

-Toplam hacmi (gDNA dâhil) 13 µL olan her bir PCR tüpüne (toplam 16 adet) 2.5 µL rasgele primer (random primer) eklenerek toplam hacim 15.5 µL'ye ulaşmıştır.

-Pipetaj yapıp ve tüpler 95 °C de 3 dakika bekletilerek DNA denaturasyonu gerçekleştirilmiştir.

-Süre sonunda tüpler buz içerisinde bekletilmiştir (Tablo 3.4).

Olgu gDNA'ları Cyanine 5 (Cy5) ve referans DNA'ları da Cyanine 3 (Cy3) flor kromlarla işaretlenmiştir. Bu aşamada ayrı ayrı Cy3 ve Cy5 etiketleme ana karışımları (EAK) Tablo 3.5'deki sıra ile ve buzun üzerinde hazırlanmıştır.

Tablo 3.4: DNA denatürasyonu ve fragmentasyonu için ısı döngüleyicisi programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	95 °C	3 dk.
2	4 °C	∞

Tablo 3.5: Etiketleme Ana Karışımı Hazırlanışı

Bileşen	Reaksiyon başına (µL)	8 reaksiyonluk (fazlası dâhil) (µL)
5X Reaksiyon Tamponu	5.0	42.5
10X dNTP	2.5	21.25
Cyanine 3-dUTP veya Cyanine 5-dUTP	1.5	12.75
Exo (-) Klenow	0.5	4.25
Son Hacim	9.5	80.75

-Referans gDNA'larının bulunduğu PCR tüplerinin her birine 9.5 µL Cy 3-dUTP, olgu gDNA'ları içeren tüplere ise aynı miktarda Cy5-dUTP (boya) ana karışımlarından eklenerek, toplam hacimleri 25 µL olan PCR tüplerine pipetaj yapılmıştır.

-DNA etiketlenmesi reaksiyonları Tablo 3,6'da belirtilen ısı döngüleyici programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.6: DNA Etiketlemesi için ısı döngüleyicisi programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	37 °C	2 saat
2	65 °C	10 dakika
3	4 °C	∞

3.3.5 Etiketlenmiş gDNA'nın temizlenmesi

Etiketlenmiş gDNA'ların temizlenmesinde Amicon Ultra-0.5, 30 kDa filtre kullanılarak aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir:

- Her bir reaksiyon tüpüne 430 µL 1xTE (pH 8.0) eklenmiştir.
- 1.5 µL'lik mikrofüj tüplerinin içine Amicon Ultra-0.5, Ultracel-30 Membran, 30 kDa Filtreler yerleştirilmiş ve etiketlenmiş olan her bir gDNA (örnek ve referanslar dâhil toplam 16 adet) bu filtrelere yüklenmiştir. İçerisinde filtre bulunan tüpler oda sıcaklığında 10 dk. boyunca 14,000 x g 'de santrifüj edilmiştir. Altta kalan kısım atılmıştır.
- Her bir reaksiyon tüpüne 480 µL 1xTE (pH 8.0) eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. boyunca 14,000 x g'de santrifüj edilmiştir. Altta kalan kısım atılmıştır.

- Filtreler yeni 1.5 µL'lik mikrofüj tüplerinin içine ters çevrilerek yerleştirildi. Oda sıcaklığında 1 dk. boyunca 1,000 x g 'de santrifüj edilerek temizlenmiş örnek elde edilmiştir. Temizleme işlemi sonunda her bir tüpte yaklaşık olarak 20-32 µL hacim kalmıştır.

3.3.6 Ürün miktarı ve spesifik aktivite hesaplanması

Ürün miktarı ve spesifik aktivite hesaplanması için NanoDrop ND-1000 UV- VIS Spektrofotometresi kullanılmıştır:

- NanoDrop Program menüsünden MikroArray Ölçümü seçildikten sonra örnek tipi DNA-50 olarak ayarlanmıştır.

- Cihazın ölçüm ayarını sıfırlamak için TE tamponundan 1.5 µL kullanılmıştır.

- Temizlenmiş etiketli her gDNA örneğinden 1.5 µL kullanılarak her örneğin A260nm (DNA), A550nm (cyanine 3), A650nm (cyanine 5) absorbansı, gDNA konsantrasyonu ve hacmi ölçülmüştür.

- Spesifik Aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Spesifik Aktivite} \left(\frac{\mu\text{g gDNA başına pmol boya}}{\mu\text{g}} \right) = \frac{\mu\text{L boya başına pmol}}{\mu\text{L gDNA başına } \mu\text{g}}$$

-Ürün miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Ürün miktarı } (\mu\text{L}) = \frac{\text{DNA konsantrasyonu (ng/}\mu\text{L)} \times \text{Örnek Hacmi } (\mu\text{L})}{1000 \text{ ng/}\mu\text{g}}$$

- Spesifik aktivite ve ürün miktarı ile ilgili beklenen değerler Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7: Beklenen spesifik aktivite ve ürün miktar değerleri

Giriş gDNA (µg)	Ürün Miktarı (µg)	Cyanine-3 işaretli Referansların spesifik aktivitesi (pmol/µg)	Cyanine-5 işaretli Örneklerin spesifik aktivitesi (pmol/µg)
0.2-0.5	2.5-3	15-25	15-20

- Etiketleme sonrası Cy3 ve Cy5 ürün miktarları birbirinin aynı olması gerekmektedir. Etiketlenmiş olgu gDNA'sı ile referans gDNA'lar bu aşamada eşit miktarlarda birleştirilerek iki renkli prob haline getirilmiştir.
- Cy3 ile etiketlenmiş referans gDNA içeren karışım (8 adet) ile Cy5 ile etiketlenmiş olgu gDNA'sı içeren karışım (8 adet) tek bir PCR tüpünde bu prensip doğrultusunda birleştirilmiştir.

3.3.7 Etiketlenmiş gDNA'nın hibridizasyona hazırlanması

- Oligo aCGH Hibridizasyon Kiti içerisinde liyofilize halde olan 10X bloke edici ajan 1.350 µL distile su eklenerek dilüe edilmiştir.
- Oda sıcaklığında 60 dk. bekletilmiştir ve vorteks karıştırıcıda döndürüldükten sonra hibridizasyon ana karışımında kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

Hibridizasyon ana karışımı, buzun üzerinde Tablo 3.8'deki sıra ve miktarlarda hazırlanmıştır.

Tablo 3.8: Hibridizasyon Ana Karışımı Hazırlanması

Bileşen	Hibridizasyon başına hacim (µL)	8 reaksiyonluk (fazlası dâhil) (µL)
Cot-1 DNA (1.0 mg/mL)	2	20
10X aCGH Bloke Edici Ajan	4.5	45
2X HI-RPM Hibridizasyon Tamponu	22.5	225
Son Hacim	29	290

- Her olgu için işaretli gDNA ve referans DNA içeren karışımdan 16 µL alınarak ve üzerine hibridizasyon ana karışımından da 29 µL eklenerek toplam hacmi 45 µL olan yeni 8 tüpe Tablo 3.9'da yer alan ısı döngüleyicisi programı uygulanmıştır.

Tablo 3.9: Isı döngüleyicisi programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	95 °C	3 dakika
2	37 °C	30 dakika

3.3.8 Mikroarray hibridizasyonu

- 8x60K mikrodizini, cam lam üzerine basılmış olarak kit içerisinde ulaştırılmaktadır.

- Hibridizasyon haznesine temiz contalı lam, açıklıkları üste bakacak şekilde haznenin tabanına tam olarak oturduğundan emin olunarak yerleştirilmiştir.

- Conta ile çevrelenen bölgede bulunan sekiz adet örnek koyma kısmına hibridizasyon örnek karışımından 40 µL "sürükle ve dağıt" usulüne uygun olarak eklenmiştir.

- Problar, cam lamine "Agilent" etiketli yüzüne basılmıştır. Bu yüz aktif kısım; numerik barkodun olduğu kısım ise "inaktif kısım" olarak adlandırılmaktadır.

- Aktif kısmı contalı lamine üst yüzeyine; numerik barkod kısmı yukarı, Agilent etiketli barkod kısmı aşağı bakacak şekilde yerleştirilmiştir.

- Cam lamlar mikroyarraye zarar vermemek için kenarlarından dikkatlice tutuldu ve lamların yüzeyine hiç bir suretle dokunulmamıştır.

- Hibridizasyon haznesi kapağı kapatıldı, mandal kaydırılmış ve döndürülerek sıkılmıştır.

- Hazne dik olarak döndürülerek lamlar tamamen karışım ile temas ettirilmiş ve baloncuklar kontrol edilmiştir.

- Kapatılmış lam haznesi 65 °C'ye ayarlanmış hibridizasyon fırınındaki rotator yuvaya yerleştirilmiştir.

- Denge için yuvanın simetriğine ayrı boş bir hibridizasyon haznesi yerleştirilmiştir.

- Rotator hızı 20 devir/dk'ya ayarlanmıştır.

- Mikrodizin lamları, 65 °C'de 16-24 saat hibridizasyona bırakılmıştır.

3.3.9 Hibridizasyon sonrası yıkama

Hibridizasyon sonrası yıkama işlemlerinin gerçekleştirileceği malzemeler, önceki deneylerden kalan stabilizasyon vb. solüsyon bulaşıklarını temizlemek için asetonitril solüsyonu ile yıkanmışlardır. Bu doğrultuda;

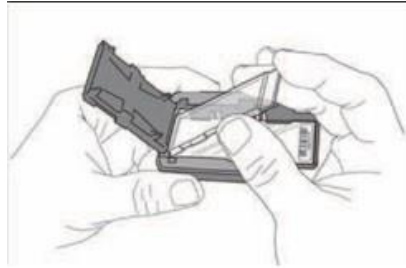
- Yıkama tamponu 1'i içeren iki adet cam tabak, yıkama tamponu 2'yi içeren bir adet cam tabak, lam yıkama plakaları ve manyetik karıştırıcı çubuk kullanılmadan önce %100 asetonitril ile oda sıcaklığında, çeker ocak içerisinde, manyetik karıştırıcı yardımı ile 5 dk. boyunca yıkanarak kurutulmuştur.

- Asetonitril ile yıkanmış olan malzemeler, en az beş defa distile sudan geçirilerek malzemelerden asetonitril uzaklaştırılmıştır.

- 16-24 saatlik hibridizasyon süresinin bitimi sonrasında, hibridizasyon haznesi yıkama tamponu 1'in bulunduğu cam tabak içinde birbirlerinden ayrılmış ve mikrodizin lamaları yıkama tamponu 1'in bulunduğu cam tabaktaki lam yıkama plağına yerleştirilerek 5 dk. boyunca bekletilmiştir

-Takip eden aşamada, lam yıkama plağı, 37 °C'ye ayarlı manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan cam tabakta bulunan yıkama tamponu 2 içerisinde 1 dk. bekletildikten sonra emdirme kâğıdının üzerine alınmıştır. Optimum performans için bir gece boyunca 37 °C'ye ayarlanmış su banyosuna beher içinde bırakılan yıkama tamponu 2, yıkama işleminin hemen öncesinde 37 °C'ye ayarlı manyetik karıştırıcı plakaya yerleştirilmiştir.

- Mikroarray lamı, lam tutucusuna "Agilent" etiketi dış ve üst tarafa bakacak şekilde yerleştirildi, ozon bariyer lam kapağı da Şekil 3.2'de gösterildiği gibi lamın üzerine yerleştirilerek lam tutucusunun tırnağı yardımı ile kapatılmıştır.



Şekil 3.2: Mikroarray lamının lam tutucuya yerleştirilmesi ve ozon-bariyer lam kapağının kapatılması işlemi

3.3.10 Mikroarray taratılması

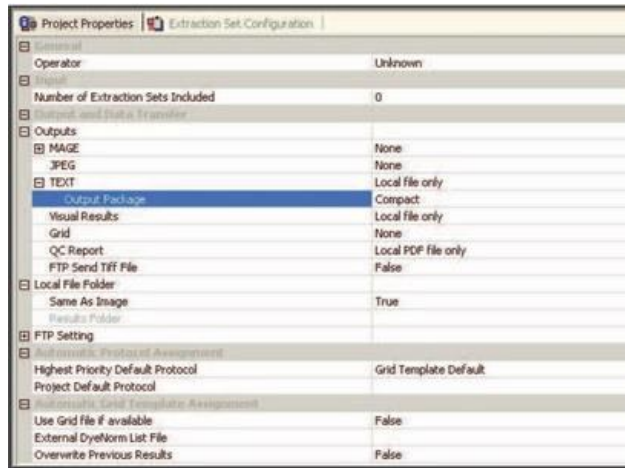
Lam tutucu, taratıcı cihaz karoseline yüklenmiştir. Bilgisayardan "Scan Control" programı açıldı ve aşağıda belirtilen ayarlar yapılmıştır.

- 8x60K mikroarrayi için Profile AgilentG3_CGH seçilmiştir.
- Slide ID <Auto Detect> olarak seçilmiştir.
- Channels R+G olarak ayarlanmıştır.
- Scan Region Agilent HD (61x21.6 mm) olarak ayarlanmıştır.
- Resolution 3 µm'ye ayarlanmıştır.
- Tiff 16 bit'e ayarlanmıştır.
- R PMT ve G PMT %100'e ayarlanmıştır.

- XDR ayarı <No XDR>'ye ayarlanmıştır.
- İmaj dosyasının çıkartılacağı klasör dizini seçilmiştir.
- Tarayıcı durum menüsünden "tarayıcı hazır" ifadesi görüldükten sonra mikroarrayin karuselde yerleştirildiği yuva "Slot m-n" (m ilk yuva n son yuva) olarak belirtilip tarama başlatılmıştır.

3.3.11 İmaj dosyalarının analizi

Tarama işlemi bittikten sonra aberasyonları analiz etmek için imaj dosyasından (.tiff) veri çıkartma ve log oranlarına dönüştürme işlemi yapmak amacıyla Feature Extraction 10.5.1.1 ve Agilent CytoGenomics 2.7.11.0 yazılımları kullanılmıştır. Feature Extraction yazılımının ayarları Şekil 3.3'de gösterildiği gibi yapılmıştır.

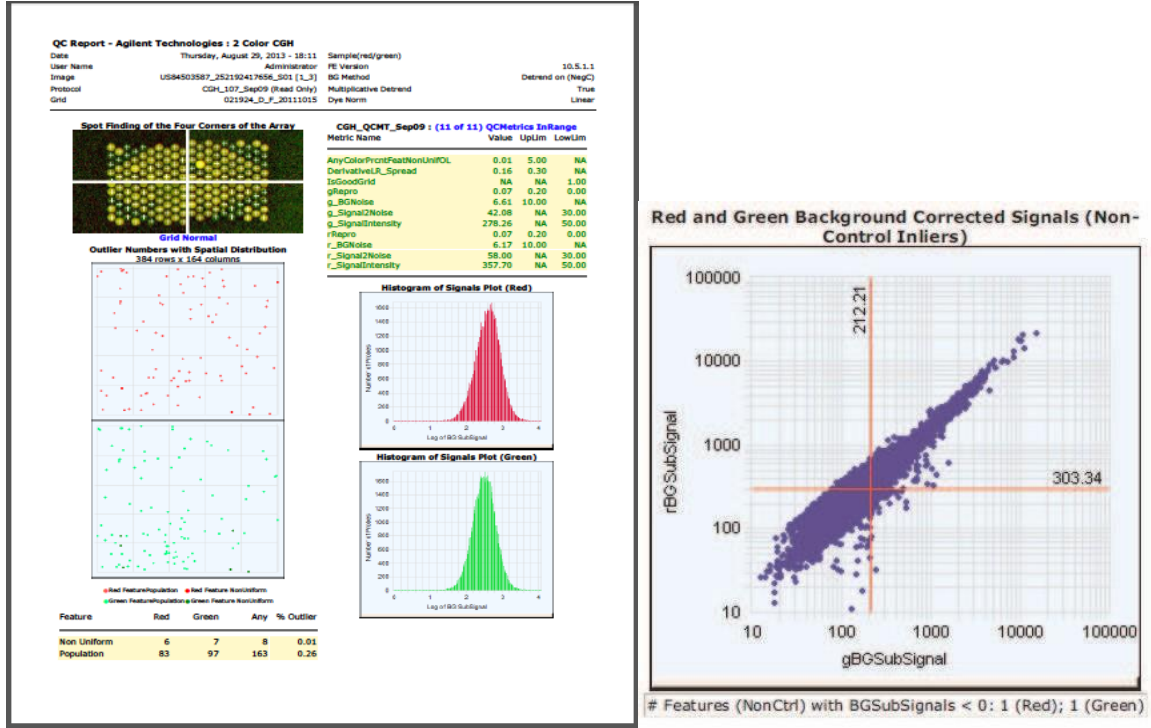


Şekil 3.3: Feature Extraction 10.5.1.1 Yazılımının Standart Ayarları

Feature Extraction 10.5.1.1 yazılımı deneyin kalitesi ile ilgili Şekil 3.4'de örnek verildiği üzere kalite kontrol raporu vermektedir. Ayrıca enzimatik etiketleme için kalite kontrol metrik eşik değerleri Tablo 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.10: Enzimatik etiketleme için kalite kontrol metrik eşik değerleri

Metrik Değer	Mükemmel	İyi	Değerlendir
Arka Plan Gürültüsü (BGNoise)	<10	10-20	>20
Sinyal Yoğunluğu (Signal intensity)	>150	50-150	<50
Sinyal/Gürültü (Signal to Noise)	>100	30-100	<30
Tekrarlanabilirlik (Reproducibility)	<0.05	0.05.-0.2	>0.2
DLRSspread	<0.2	0.2-0.3	>0.3



Şekil 3.4: Feature Extraction 10.5.1.1 yazılımının verdiği CGH Kalite Kontrol Raporu Örneği

3.3.12 İstatiksel analiz

Çalışmamızda tanımlanan CNV'ler, DGV web sitesindeki (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) fenotip olarak normal bireylerden oluşan kontrol popülasyonlarında saptanan CNV'ler ile karşılaştırılmıştır. Bu veri tabanındaki kontrol popülasyonları genellikle CNV frekanslarının tanımlanmasında referans olarak kullanılmaktadır. Bu popülasyonlar farklı etnik kökenleri olan (Caucasian, Asian, African) sağlıklı kadın ve erkeklerden oluşmaktadır. Analiz sonucu elde ettiğimiz her bir kromozomdaki CNV bölgelerinin kontrol popülasyonu ile karşılaştırılmasında Minitab® 17.1.0 yazılımı kullanılarak ikili oran testi (two proportion test) yapılmıştır. POY çalışma grubuna (n=55) ait CNV'lerin kontrol popülasyonları ile istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda P değeri %95 güven aralığı ile $p < 0,05$ olan bölgeler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4- BULGULAR

Çalışmamızda; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından değerlendirilerek Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na yönlendirilen ve klasik sitogenetik analizleri normal olarak saptanan 55 POY olgusunun genomik kopya sayısı düzensizlikler açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu hedef doğrultusunda etiyolojide rol oynayan *FMR1* genindeki CGG artışına yönelik dinamik mutasyon (CGG tekrar sayılarının) analizi *FMR1* Sizing PCR tekniği ile yapılmıştır. Kromozom analizleri normal olan ve *FMR1* premutasyon saptanmayan olgularda, tüm genoma yönelik genomik kopya sayısı değişimleri, çözünürlüğü daha yüksek olan mikrodizin analizi ile değerlendirilmiştir.

4.1 - Olguların Klinik Özellikleri

Çalışmamıza dâhil edilen 55 POY olgusunun tamamı sekonder amenore olup, yaş ortalamaları $30,4 \pm 6,36$ idi. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından olguların hormon profili (FSH, LH, E2, progesteron, prolaktin, TSH, serbest T3-T4, DHEASO4, testesteron, SHBG), tam kan sayımı, Anti-tiroid peroksidaz ve Antitiroglobulin, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri, glikoz tetkikleri, kan lipidleri tetkikleri yapılmıştır. Anamnezlerde hormon replasman tedavisi (HRT), metabolik ve endokrin hastalık öyküsü sorgulanmıştır (Tablo 4.1). POY tanısı ile Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na yönlendirilen olgular sendromik hastalıklar, ailesinde açıklanamamış mental retardasyon, gelişim geriliği, demans, tremor/ataksi sendromu açısından sorgulanmış ve sendromik olmayan POY tanısı alan tüm olgularda karyotip analizi ve *FMR1* geninin fragman analizi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.1: Çalışmamıza dâhil olan olguların klinik özeti

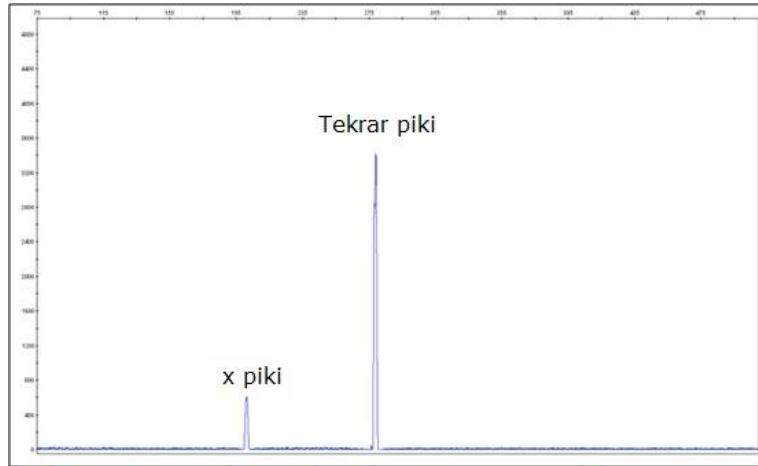
Olguların Klinik Özellikleri	
Klinik veriler	Sekonder amenore (SA)
Olgu yaşı	$30,4 \pm 6,36$
Tanı yaşı (ortalama)	$27,4 \pm 6$
Menarş yaşı (ortalama)	$13,4 \pm 1$
Tanı FSH düzeyleri (>40 IU/L)	63,5
Ailesel POY	6 olgunun anne menopoz yaşı 38
Tanıdan önce spontan gebelik	5 olgu
HRT kullanımı	14 olgu
Fertilite	36 olguda infertilite, 5 olgu fertil, 14 olgu bilinmiyor
Metabolik-endokrin hastalık	Guatr (olgu no 45)

4.2 -Frajil X Analiz Verileri Tekrar Sayısı Aralıkları

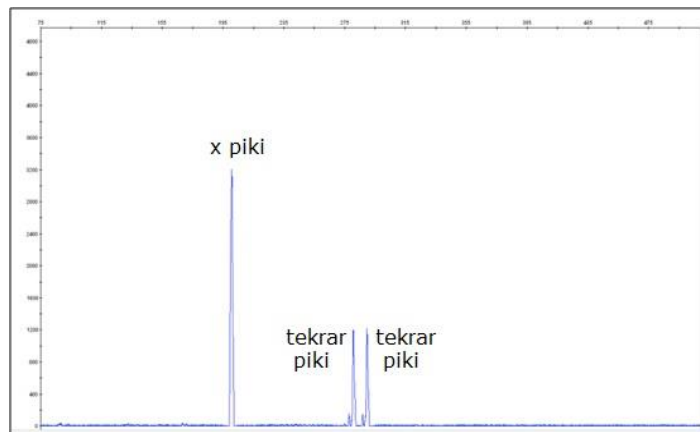
Olgularda *FMR1* geni CGG tekrar sayısı aralıklarını belirlemek için Frajil X Sizing PCR kiti (Abbott) protokolü uygulanmıştır.

Çalışmaya dâhil edilen 55 olgunun DNA izolasyonu sonrası, DNA miktarı ve kalitesi Nanodrop spektrofotometre ile ölçülerek örnekler 10-25ng/µm'ye ayarlanmıştır. ABI 3130 kapiller jel elektroforez cihazına yüklenen örneklerin analizi "Genemapper Generic" programında "microsatellite default metod" kullanılarak sırasıyla kısa ve uzun size standart okuması uygulanarak gerçekleştirilmiştir. İstenilen kalitede pik elde edilemediği durumlarda çalışma tekrarlanmıştır.

Olgulara ait fragman analizi sonuçları değerlendirildiğinde en düşük CGG tekrar sayısı 22,3, en yüksek tekrar sayısı da 39 olmak üzere ortalama 29 CGG tekrar dizisi olarak tespit edilmiştir. Genel toplumda CGG tekrar dizileri 55-200 arasında olduğu zaman premutasyon olarak değerlendirilmektedir. Bu oran 45-200 arasında olduğu zaman prematür over yetmezliği için risk oluşturmaktadır. Bizim analiz sonuçlarımıza göre premutasyon taşıyıcılığı gözlenmemiştir. Şekil 4.1 ve 4.2'de iki farklı olguya ait homozigot ve heterozigot fragman analizi görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.1: *FMR1* geninde tekrar sayısı 28 homozigot olan, 29 numaralı olguya ait fragman analizi görüntüsü.



Şekil 4.2: *FMR1* geninde tekrar sayısı 28 ve 29 heterozigot olan, 31 numaralı olguya ait fragman analizi görüntüsü.

4.3- Olgularda Saptanan Kopya Sayısı Değişiklikleri (CNV'ler)

Tüm genomdaki kopya sayısı değişikliklerinin değerlendirildiği a-CGH analizlerinde doğru ve güvenilir analiz için, genel olarak deneyin kalitesi ve enzimatik etiketlemenin kalitesinin değerlendirildiği Feature Extraction 10.5.1.1 yazılımı tarafından verilen kalite kontrol raporuna göre, metrik eşik değerleri "mükemmel, iyi ve değerlendirilebilir" olan örneklerde analiz yapılması gerekmektedir. Deneylerimizde tüm örnekler belirtilen kriterlere uygun olduğu için değerlendirmeler 55 örnek üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Kopya sayısı değişiklikleri toplam 55 olgunun 22'sinde (~%40) saptanmıştır. Tablo 4.2'de de görüldüğü üzere 22 örnekte toplam 15 farklı bölgede CNV tespit edilmiştir.

Cytogenomics 2.7.11.0 analiz programındaki aberasyon görüntülerine ait örnekler Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

Saptanan anomali tipleri değerlendirildiğinde;

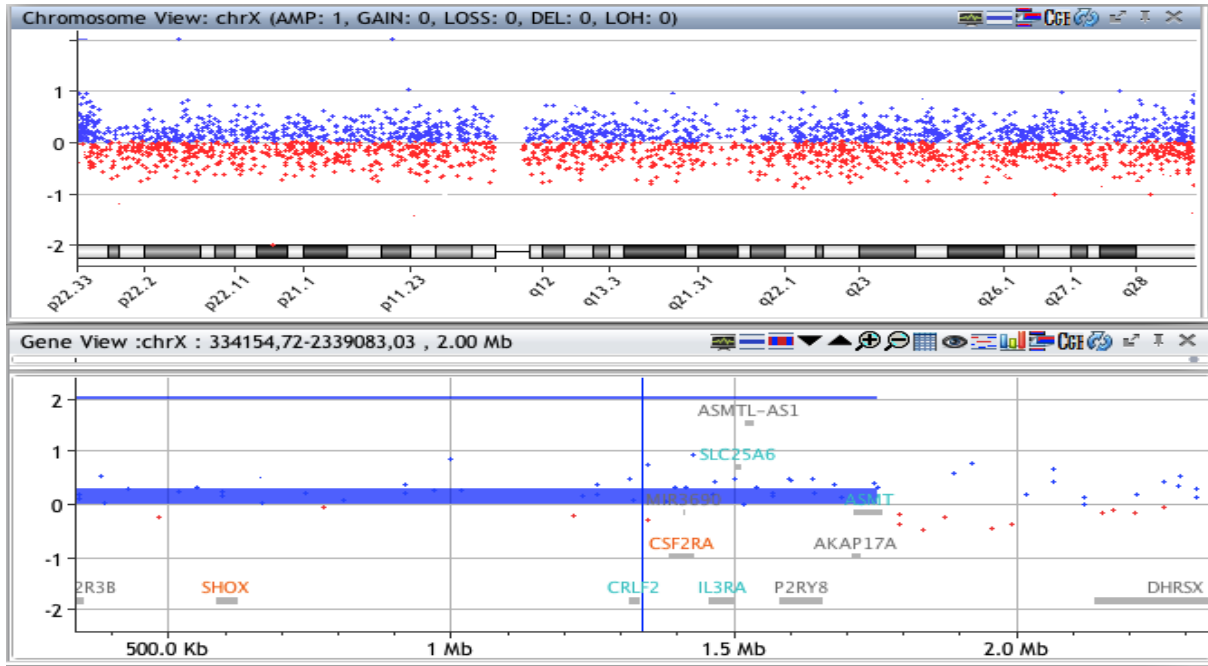
%60'ının (9/15) delesyon,
%27'sinin (4/15) duplikasyon,
%13'ünün (2/15) ise aynı bölgede hem delesyon hem de duplikasyon olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.2: aCGH Analiz Sonuçları

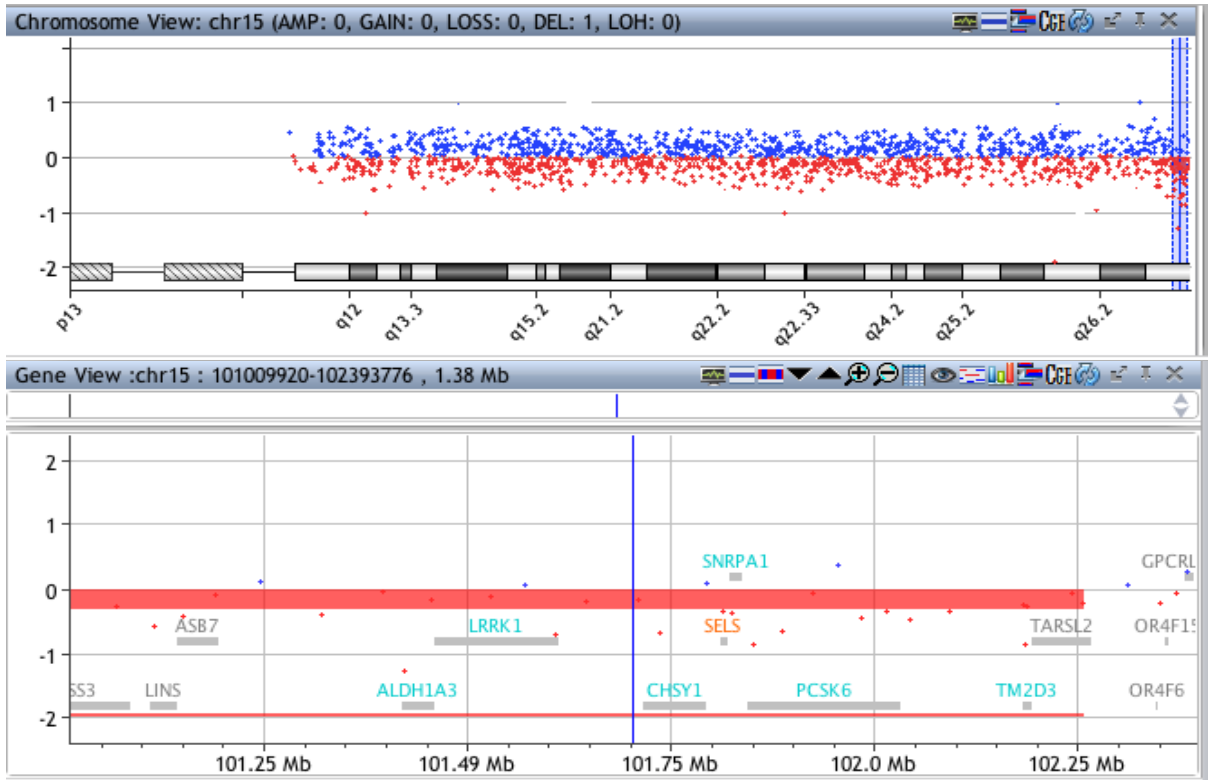
Kromozom	Başlangıç (bp)	Bitiş (bp)	Büyükük kb	Prob	Kayıp/ Kazanç	Gen	Olgu No	Tanı yaşı	HRT	Infertilite
chr12p13.33	1.476.151	1.842.221	366.071	11	Amp	ADIPOR2	1	21	-	+
chr3p13	70.921.422	71.113.993	192.572	5	Del	FOXP1	2	15	+	+
chrXq21.2 - q21.31	86.144.038	88.305.581	2.161.544	22	Del	KLHL4,CPXCR1	3	22	-	+
chr3p13	70.868.754	71.041.666	172.913	4	Del	FOXP1				
chr2q21.2	27.230.992	27.656.313	425.322	27	Del	MPV17,EIF2B4,UCN	4	17	+	bilinmiyor
chr16q24.3	89.765.758	90.111.263	345.506	25	Del	FANCA,SPIRE2				
chr2q23.3 - q24.1	156.720.708	157.439.740	719.033	11	Del	NR4A2	7	18	-	bilinmiyor
chr8p12	31.110.570	31.497.313	386.744	4	Del	NRG1	8	23	+	+
chr16p13.3	333.753	863.069	529.317	12	Del	AXIN1				
chr4p16.2	4.673.284	4.979.914	306.631	6	Amp	MSX1	9	36	-	bilinmiyor
chr15q26.3	100.872.892	102.256.748	1.383.857	35	Del	ADAMTS17,PCSK6				
chr16p13.3	2.565.008	2.963.720	398.713	15	Amp	PDPK1				
chr3p13	70.921.422	71.041.666	120.245	3	Del	FOXP1	11	33	-	bilinmiyor
chr2q24.1	156.522.754	157.511.681	988.928	13	Del	NR4A2	13	30	-	bilinmiyor
chrXp22.33	169.064	2.362.192	2.193.129	79	Amp	ASMTL,P2RY8,SHOX				
chrXp22.33	169.064	2.778.548	2.609.485	94	Amp	ASMTL,P2RY8,SHOX	14	22	-	bilinmiyor
chr15q26.3	101.607.232	102.351.195	743.964	22	Del	PCSK6	15	29	-	+
chrXp22.33	169.064	2.778.548	2.609.485	94	Amp	ASMTL,P2RY8,SHOX				
chrXp22.33	298.292	2.362.192	2.063.901	75	Amp	ASMTL,P2RY8,SHOX	17	22	+	+
chrXp22.33	169.064	2.778.548	2.609.485	94	Amp	ASMTL,P2RY8,SHOX	19	32	+	+
chr2p21	44.173.246	44.218.777	45.532	3	Del	LRPPRC	20	32	-	+
chrXp22.33	298.292	2.778.548	2.480.257	90	Amp	ASMTL,P2RY8,SHOX	21	26	-	+
chr10q21.3	69.583.117	69.748.511	165.395	6	Amp	SIRT1,HERC4	24	38	+	-
chr7p22.3	227.765	1.370.682	1.142.918	18	Del	SUN1	30	37	-	+
chr15q26.3	101.421.655	102.369.897	948.243	27	Del	PCSK6				
chr3q26.31	172.694.812	172.766.774	71.963	3	Amp	SPATA16	31	28	-	bilinmiyor
chr3p13	71.573.829	71.733.309	159.481	5	Del	FOXP1	32	24	-	bilinmiyor
chr15q26.3	101.421.655	102.383.473	961.819	28	Del	PCSK6				
chrXp22.33	209.659	2.709.086	2.499.428	91	Del	ASMTL,P2RY8,SHOX	33	28	-	+
chr15q26.3	101.421.655	102.310.654	889.000	25	Del	PCSK6	44	29	-	+
chr3p13	70.921.422	71.113.993	192.572	5	Del	FOXP1	53	29	-	+

CNV Gözlenen Toplam Hasta Sayısı

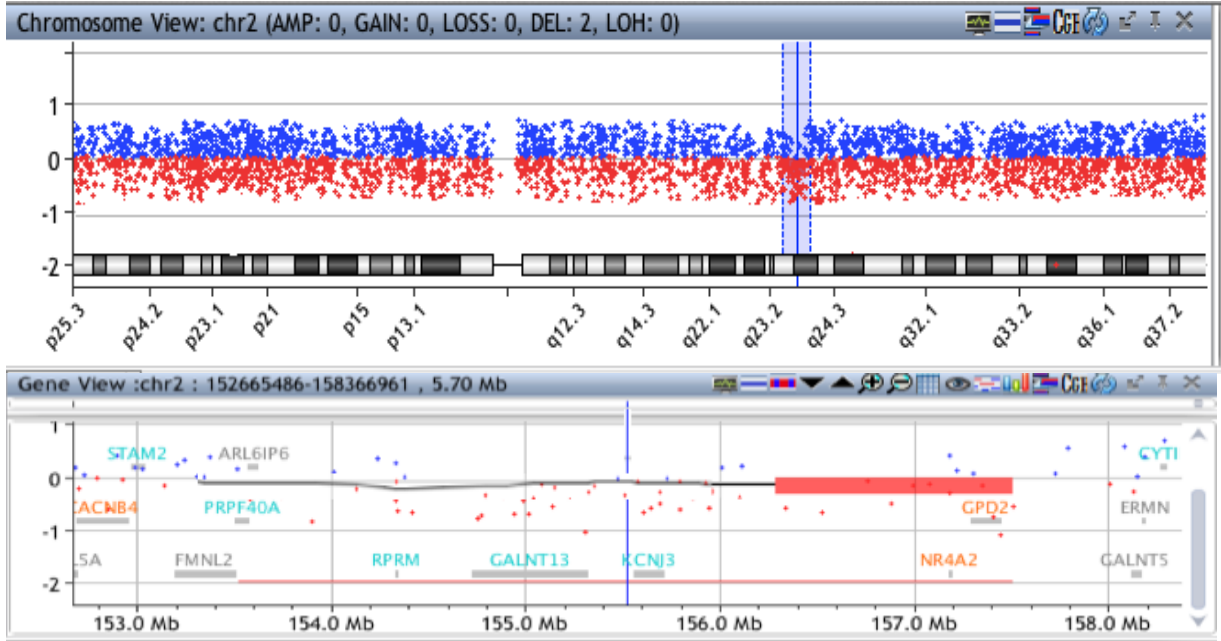
22



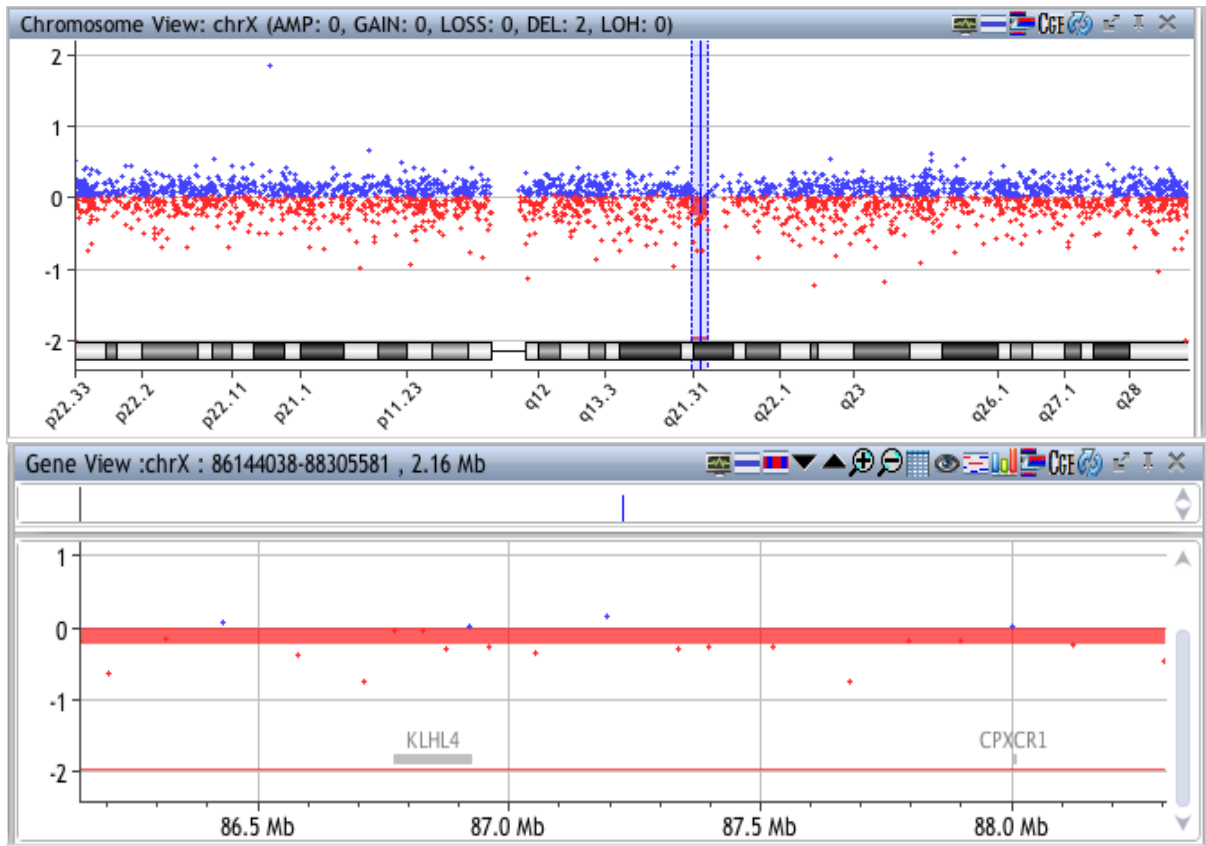
Şekil 4.3: 17 nolu olguda Xp22.33 bölgesi duplikasyonu (2,00 Mb) a-CGH görüntüsü



Şekil 4.4: Beş olguda gözlenen (9,15,30,32,44) 15q26.3 bölgesi delesyonu (1.38Mb) a-CGH görüntüsü



Şekil 4.5:Olgu 13'e ait 2q24.1 bölgesi delesyonu (0,98 Mb) a-CGH görüntüsü



Şekil 4.6:Olgu 3'e ait Xq21.2-q21.31 bölgesi delesyonu (2,16 Mb) a-CGH görüntüsü

4.3.1 Saptanan Anomalilerin Kromozomlara göre Dağılımları

Anomaliler kromozom tipleri açısından değerlendirildiğinde;

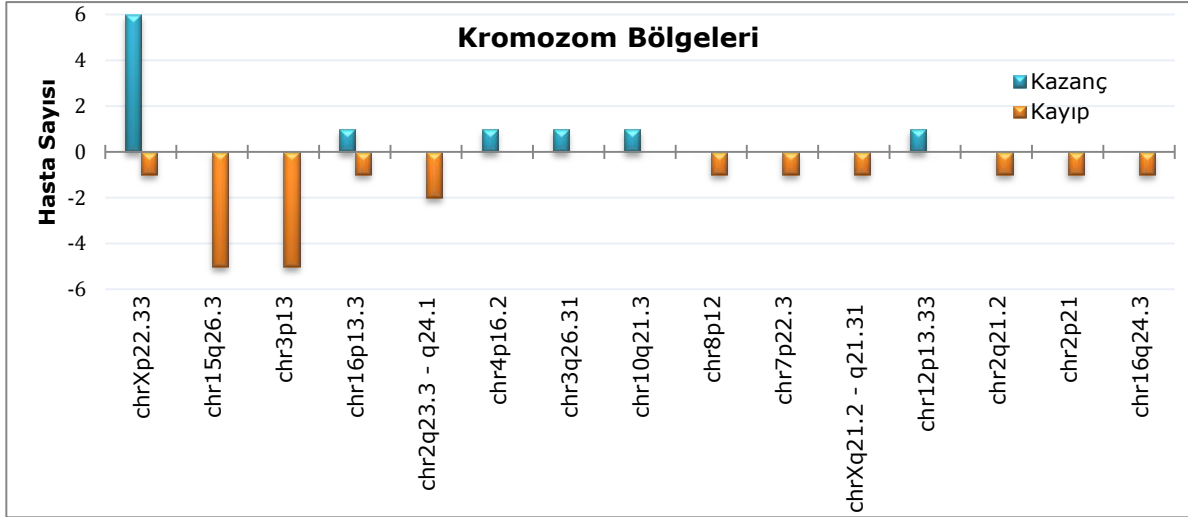
13 tanesi otozomal kromozomda iken 2 CNV X kromozomuna lokalizedir.

Toplam 8 olguda gözlenen X kromozomu kopya sayısı değişimlerinden 2 tanesi delesyon (Xp22.33 ve Xq21.2-q21.31) ve 6 tanesi de aynı bölgede (Xp22.33) kazanç olarak tespit edilmiştir.

Otozomal kromozomlardaki anomalilere (13 anomali) bakıldığında 8 tanesinin delesyon, 4 tanesinin kazanç ve 1 tanesinin de (16p13.3) hem kayıp hem kazanç tipinde olduğu gözlenmiştir. Kopya sayısı değişikliklerinin kromozomlara göre dağılımları Tablo 4.3'de ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.3: Kopya sayısı değişikliklerinin kromozomlara göre dağılımı

Kromozom	Kromozom Bölgesi	Kayıp/ Kazanç	Sıklığı	Gözlenen Olgu sayısı
2	q23.3 - q24.1	Del	3,64%	2
	q21.2	Del	1,82%	1
	p21	Del	1,82%	1
3	p13	Del	9,09%	5
	q26.31	Amp	1,82%	1
4	p16.2	Amp	1,82%	1
7	p22.3	Del	1,82%	1
8	p12	Del	1,82%	1
10	q21.3	Amp	1,82%	1
12	p13.33	Amp	1,82%	1
15	q26.3	Del	9,09%	5
16	p13.3	Amp/Del	3,64%	2
	q24.3	Del	1,82%	1
X	p22.33	Amp/Del	12,73%	7
	q21.2 - q21.31	Del	1,82%	1



Şekil 4.7: Kopya sayısı değişikliklerinin kromozomlara göre dağılımı

Yukarıda da ifade edildiği gibi kromozom Xp22.33 bölgesi anomalileri 7 olguda (%12,73) gözlenmiştir. Bu bölgede POY ile ilişkili *ASMTL*, *P2RY8*, *SHOX* genleri lokalizedir.

Kromozom 3p13 bölgesinde *FOXP1* genini içeren delesyon 5 olguda (%9,09),

Kromozom 15q26.3 bölgesinde *PCSK6* genini içeren delesyon 5 olguda (%9,09)

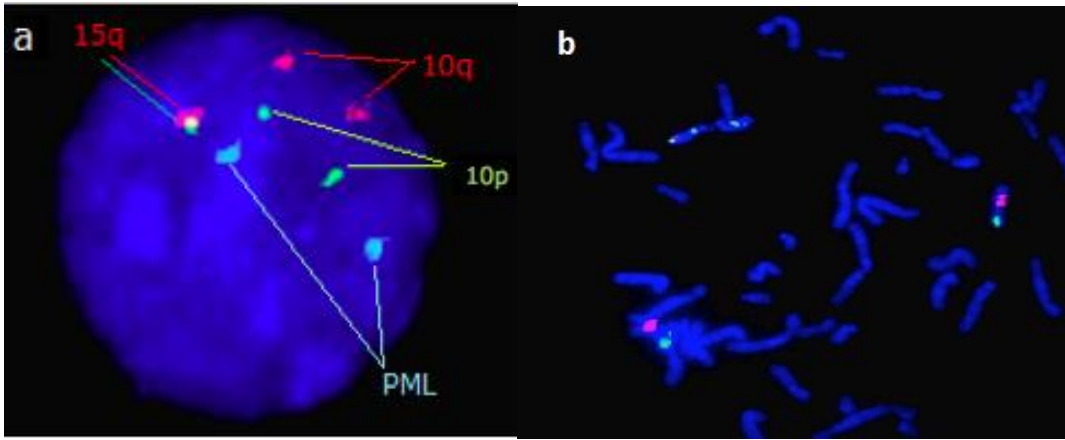
Kromozom 2q23.3-q24.1 bölgesinde *NR4A2* genini içeren delesyon iki olguda (%3,64) gözlenmiştir. Tablo 4.3'de de görüldüğü gibi diğer anomaliler birer olguda saptanmıştır. Kopya sayısı değişikliklerinin genlere göre dağılımı Tablo 4.4'de gözlenmektedir.

Tablo 4.4: Kopya sayısı değişikliklerinin genlere göre dağılımı

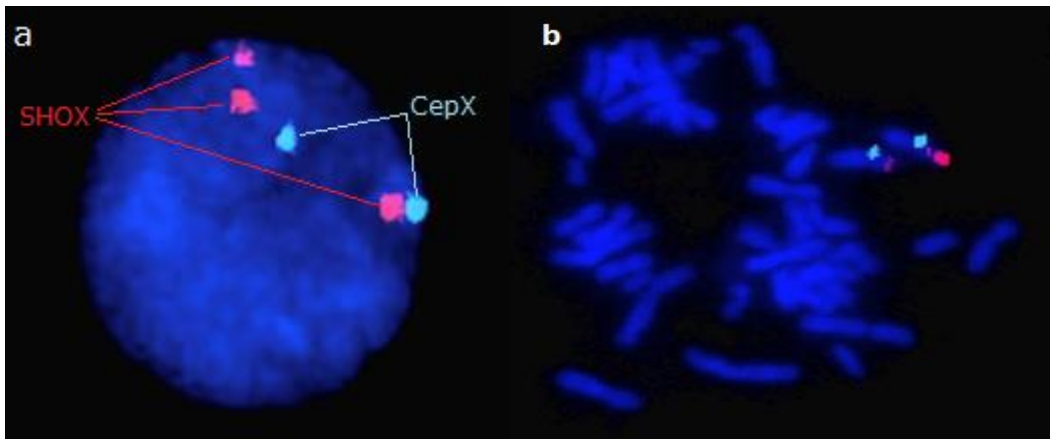
Genler	Gözlenen Olgu Sayısı	Sıklığı	Gözlenen Olgu	Kayıp/ Kazanç
<i>ASMTL,P2RY8,SHOX</i>	7	12,73%	13,14,15,17,19,21,33	Amp/Del
<i>FOXP1</i>	5	9,09%	2,3,11,32,53	Del
<i>PCSK6</i>	5	9,09%	9,15,30,32,44	Del
<i>NR4A2</i>	2	3,64%	7,13	Del
<i>NRG1</i>	1	1,82%	8	Del
<i>SPATA16</i>	1	1,82%	31	Amp
<i>AXIN1</i>	1	1,82%	8	Del
<i>ADIPOR2</i>	1	1,82%	1	Amp
<i>FANCA,SPIRE2</i>	1	1,82%	4	Del
<i>MSX1</i>	1	1,82%	9	Amp
<i>ADAMTS17</i>	1	1,82%	9	Del
<i>PDPK1</i>	1	1,82%	9	Amp
<i>KLHL4,CPXCR1</i>	1	1,82%	3	Del
<i>SIRT1,HERC4</i>	1	1,82%	24	Amp
<i>SUN1</i>	1	1,82%	30	Del
<i>MPV17,EIF2B4,UCN</i>	1	1,82%	4	Del
<i>LRPPRC</i>	1	1,82%	20	Del

Kromozom 15q26.3 (*PCSK6*) bölgesinde delesyon saptanan olgulardan 15 numaralı olgu ile 15q26.3 (*PCSK6*) ve 3p13 (*FOXP1*) bölgesi delesyonu saptanan 32 numaralı olguya ait anne-baba aCGH sonucuna göre olgulara ait delesyonların *de novo* olduğu gözlenmiştir.

Olgularda saptanan CNV'lerin konfirmasyon çalışmaları FISH analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Ancak tüm anomali bölgelerine spesifik FISH problemleri temin edilemediğinden, çalışmamızda en sık gözlenen anomali olan kromozom Xp22.33 bölgesi duplikasyonu ile 6 olgu, kromozom 15q26.3 bölgesi delesyonu ile 5 olgu toplam 11 olguya ait anomaliler FISH analizleri (sırasıyla kromozom 15q telomer -Abbott ToTelVysion vial 10 ve Microdeletion *SHOX*- Cytocell) ile değerlendirilmiş ve konfirme edilmiştir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.8:Beş olguda gözlenen (9,15,30,32,44) 15q26.3 bölgesi delesyonunun 44 numaralı olgudaki FISH görüntüsü. (a)İnterfaz hücreleri, (b)Metafaz : Telomerik 10p ve 15q (Sp.Green), telomerik 15q ve 10q (Sp.Red),15.kromozomda LSI PML (Sp.aqua). 15q'ya ait tek sinyal olduğu için delesyon gözlenmiştir.



Şekil 4.9: Altı olguda gözlenen (13,14,15,17,19,21) xp22.33 bölgesi duplikasyonunun 15 numaralı olgudaki FISH görüntüsü. (a)İnterfaz hücreleri, (b)Metafaz : Kromozom Xp *SHOX* sinyali (Sp.red), kromozom X sentromer sinyali (Sp.aqua). (a)'da *SHOX* bölgesinde duplikasyon (kırmızı sinyal), iki adet X kromozom sentromer sinyali

Çalışmamızda saptanan tüm CNV'ler, polimorfizmler açısından;

- DGV (Database of Genetic Variant) (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), ("Database of Genomic Variants," 2014a)
- PubMed kapsayan NCBI (National Center for Biotechnology Information)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),
- UCSC (University of California, Santa Cruz) ([http:// genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/)),
- GeneCards (<http://www.genecards.org/>),
- DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources) (<http://decipher.sanger.ac.uk/>)
- OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) (<http://omim.org/>)

veri tabanları kullanılarak analiz edilmiştir. Yüksek frekansta saptanan CNV'ler benign polimorfizmler olarak değerlendirilerek analize dâhil edilmemişlerdir.

Kontrol popülasyonları ile çalışmamızda saptanan CNV'lerin istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucu anlamlı farklılıkların gözleendiği CNV'ler Tablo 4.5'de, anlamlılık saptanmayan CNV'ler ise Tablo 4.6'da verilmiştir. Tablo 4.5'de de görüldüğü gibi istatistiksel önemi olan 4 adet kromozomal bölgeye ait CNV bulunmaktadır. Bu bölgelerin 3 tanesi kayıp (3p13, 15q26.3 ve Xq21.2-21.31), 1 tanesi kazanç (Xp22.33) olarak gözlenmiştir. Gözlenen değişiklikler FISH yöntemi ile doğrulanmıştır.

Tablo 4.5: POY çalışma grubuna (n =55) ait istatistiksel önemi olan bölgeler.

Kromozomal Bölge		Kazanc		P value	Kayıp		P value	Referans
		Olgu N=55	Kontrol		Olgu N=55	Kontrol		
Xp22.33	chrX:1821901-3194365	6	2/270	0,0160	1	0/270	0,3130	dgVID 2947981 esv2758854
	<i>SHOX</i>		0/96	0,0090		3/96.	0,6050	dgVID 3290004 esv2739508
3p13 (<i>FOXP1</i>)		-	0/95	-	5	1/95.	0,0450	dgVID 9425578 nsv834727
15q26.3	<i>PCSK6</i>	-	7/771	0,0080 p<0.01	5	0/771	0,0190	dgVID 5957296 esv34275
	<i>ALDH-LRRK1</i>		0/265	-		3/265	0,0430	dgVID 8501521 nsv469824
	<i>ADAMTS17</i>		1/112	0,3150		0/112	0,0190	dgVID 9373534 nsv817711
Xq21.2-q21.31	<i>CPXCR1</i>	-	0/2356.	-	1	252/2366	0,000 P<0.001	dgVID 8780129 nsv515219

Tablo 4.6: POY çalışma grubuna (n =55) ait istatistiksel önemi olmayan bölgeler.

Kromozomal Bölge		Kazanç		P value	Kayıp		P value	Referans
		Olgu N=55	Kontrol		Olgu N=55	Kontrol		
16p13.3	<i>AXIN1</i>	-	1/181	0,3160	1	0/181	0,3130	dgvID 1220192 esv2422427
	<i>PDPK1</i>	1	5/270	0,9860	-	1/270	0,3160	dgvID 2949194 esv2760067
2q23.3 - q24.1 (<i>NR4A2</i>)		-	0/96	-	2	1/96.	0,1500	dgvID 3271504 esv2721008
8p12 (<i>NRG1</i>)		-	1/95	0,3150	1	0/95	0,1500	dgvID 9422133 nsv831282
3q26.31 (<i>SPATA16</i>)		1	1/95	0,7130	-	0/95	-	dgvID9420646 nsv829795
12p13.33 (<i>ADIPOR2</i>)		1	0/95	0,3130	-	11/95.	-	dgvID9423155 nsv832304
16q24.3 (<i>FANCA,SPIRE2</i>)		-	9/62.	-	1	1/62.	0,9320	dgvID 11591763 nsv428331
4p16.2 (<i>MSX1</i>)		1	0/7	0,3130	-	0/7	-	dgvID 5938745 esv34196
Xq21.2- q21.31	<i>KLHL4</i>	-	1/2026.	0,3170	1	0/2026	0,3130	dgvID 8420687 esv526412
10q21.3 (<i>SIRT1,HERC4</i>)		1	0/17421	0,3130	-	1/17421	0,3170	dgvID 9305824 nsv551433
7p22.3 (<i>SUN1</i>)		-	0/92	-	1	2/92.	0,8800	dgvID 3284164 esv2733668
2p21 (<i>LRPPRC</i>)		-	1/1557.	0,3170	1	0/1557	0,3130	dgvID 8484221 nsv457174
2q21.2 (<i>MPV17,EIF2B4,UCN</i>)		-	1/95.	0,3150	1	0/95	0,1500	dgvID 9424465 nsv833614

5- TARTIŞMA

POY etiyojisinin yaklaşık %20'sinden ailesel genetik nedenler, %10'undan X kromozom anomalileri sorumludur. Fragile X mental retardation (*FMR1*) premütasyonu POY olgularında %6-13 sıklığında gözlenmektedir (Marozzi vd., 2000; Shelling, 2000). Çalışmamızda ilk olarak kromozom analizleri normal, sendromik olmayan 55 POY olgusundaki CGG trinükleotit tekrarları sonucu oluşan premütasyon taşıyıcılığını belirlemeye yönelik, *FMR1* Sizing PCR tekniği ile dinamik mutasyon fragman analizi yapılmıştır. *FMR1* premütasyon saptanmayan olgularda, tüm genomaya yönelik genomik kopya sayısı değişimleri, çözünürlüğü daha yüksek olan a-CGH analizi ile değerlendirilmiştir.

POY tanısı alan 55 olgunun fragman analizi sonuçları en düşük tekrar sayısı 22.3, en yüksek tekrar sayısı 39 olmak üzere ortalama 29 CGG trinükleotit tekrar dizisi olarak tespit edilmiştir. Normal popülasyonda 29-30 civarında olan CGG trinükleotit tekrar sayısı 45'lere ulaştığında over yetmezliği başlamaktadır. Genel toplumda ise bu oran 55-200 arasında olduğu zaman premütasyon olarak değerlendirilmektedir. İdiyopatik POY tanısı alan olguların %3'ü premütasyon taşırken, aile hikâyesi olanlara ilave olarak, ailesinde açıklanamamış mental retardasyon, gelişim geriliği, demans, tremor/ataksi sendromu hikâyesi olan kadınlarda risk daha da artmakta ve bu oran ailesel vakalarda %12 dolaylarına ulaşmaktadır (Marozzi vd., 2000; Shelling, 2000). Fragile-X çocuk sahibi ve POY olan 12 kadında yapılan çalışmada premütasyon taşıyıcılığı oranı %6,6 olarak bildirilmiştir (Tural vd., 2014). Bizim olgularımızda Frajil X çocuk sahibi olma veya ailesel mental retardasyon öyküsü yoktu ve Fragman analizi sonuçları en yüksek tekrar sayısı 39 olmak üzere, ortalama 29CGG trinükleotit tekrar dizisi olarak tespit edilmiştir. Bu oranlar Frajil X premütasyon taşıyıcılığı için risk oranları dışında, normal popülasyonda gözlenen sınırlarda kalmaktadır. Bizim analiz sonuçlarımıza göre premütasyon taşıyıcılığı gözlenmemiştir.

Kompleks ya da multigenik olarak adlandırılan multi faktöriyel hastalıkların nedenlerinin araştırılması çalışmaları SNP'lerden sonra CNV'lerin tanımlanmasını da sağlamıştır. Referans genom ile karşılaştırıldığında, 50bp-1 kb'dan daha büyük yapısal değişiklikler "kopya sayısı farklılıkları" (CNVs) olarak adlandırılmaktadırlar.

POY etiyojisi tam olarak aydınlatılamamış olsa da kromozom anomalileri, monogenik düzensizlikler ile poligenik-multifaktöriyel etkileri içeren genetik faktörlerin önemli olduğu ifade edilmektedir (Shelling & Ferguson, 2007). POY etiyojisinin %20'sini ailesel genetik nedenler oluştururken Triple X sendromu, mozaik Turner sendromu, X kromozomu delesyonları ile X-otozom translokasyonları gibi kromozom düzensizlikleri POY olgularının %10'unda rapor edilmektedir (Bennett vd., 2010). Mikroarray teknolojilerinin gelişmesi ile beraber diğer multigenik

hastalıklar ile birlikte POY'un etiyolojisinin belirlenmesine yönelik çalışmalar da hız kazanmıştır.

İlk çalışma Aboura ve arkadaşları tarafından 2009 yılında gerçekleştirilmiştir. POY tanısı almış 99 kadında geleneksel karyotip analizi ve 4500 BAC mikroarray uygulanmıştır. 3'ü X kromozomu, 28'i otozomal kromozomlar üzerinde olmak üzere toplam 31 CNV belirlenmiştir. Veriler, "Database of Genomic Variants" veri tabanında kontrol popülasyonlarla karşılaştırıldığında 8 farklı kromozomal bölgede (1p21.1, 5p14.3, 5q13.2, 6p25.3, 14q32.33, 16p11.2, 17q12 ve Xq28) istatistiksel öneme sahip CNV saptanmıştır. Beyaz ırk POY hastaları arasında yapılan bu çalışma, geniş toplulukta CNV analizine yönelik rapor edilen ilk çalışmadır. 7'si otozomal, 1'i X kromozomunda bulunan CNV içinde üremede rol alan 5 POY aday geni (*DNAH5*, *NAIP*, *DUSP22*, *NUPR1*, *AKT1*) bulunmuştur (Aboura vd., 2009). Bizim çalışmamızda otozomal kromozomlar için bildirilen CNV'ler ile ortak CNV'ye rastlanmamıştır. X kromozomunda saptanan CNV'ler ise farklı bölgelerde lokalizedirler.

Quilter ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yayınlanan diğer bir çalışmada kromozom X'deki CNV'lere odaklanılmıştır. 42 idiyopatik POY olgusunda yapılan çalışmada X/Y tiling path BAC array kullanılmıştır. Araştırmacılar otozomal kromozomlara ilişkin herhangi bir CNV bildirmemişlerdir. İlgili çalışmada, array dizaynında otozomal kromozom bölgeleri için daha düşük çözünürlükte (1 Mb) dizi kullanılması nedeniyle otozomal kromozomlarda CNV saptanmaması beklenen bir bulgudur. Kromozom Xp ve Xq üzerinde POF1B gibi daha önceden de POY ile ilişkili olduğu düşünülen genlerin bulunduğu bölgelerde dâhil olmak üzere 15 CNV tanımlanmıştır. Bu bölgelerde lokalize *XNPEP2*, *UTP14A*, *CENPI*, *PCDH19*, *VCX*, *STS*, *ZFX*, *BCORL1*, *USP9X*, *TSPAN7*, *POF1B*, *AIFM1* genlerinin POY ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Tespit edilen değişikliklerin çoğunu konfirme etmek amacıyla CNV'ler içindeki seçilen gen bölgelerine spesifik Quantitative PCR, ekspresyon paternlerinin belirlenmesi amacıyla da reverse transcription Real Time-PCR yöntemleri kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda Quilter ve arkadaşlarının tanımladığı CNV bölgeleri ile birliktelik gösteren ortak gen ve CNV bölgeleri tanımlanmamıştır (Quilter vd., 2010).

S. Ledig ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmaya da 30'u ovarian disgenезis (OD) olgusu olmak üzere, toplam 74 POY bulgusu gösteren kadın dâhil edilmiştir. Çalışmada Human Genome CGH Microarray Kit 105A kullanılmıştır. OD puberte öncesinden itibaren folikül kaybı ile karakterize, sonucunda POY gelişen en şiddetli tablodur. Bu tablonun gelişmesinde rol oynayan genetik olan veya olmayan nedenler tam olarak ortaya konulamamıştır. Çalışmada 29 mikroduplikasyon ve 15 mikrodelesyon bulunmuştur. Bu CNV'lerin yalnızca %4'ünün kromozom X ile ilişkili olduğu görülmüştür. Delesyon saptanan bölgelerle bizim bulgularımız arasında herhangi ortak kromozom lokalizasyonu veya gen bulunmamaktadır. Ancak duplikasyon olarak tanımlanan 1 CNV bölgesinin bizim bulgularımız

ile aynı kromozomal lokalizasyonda (2p21) olduğu gözlenmektedir (Ledig, Röpke, & Wieacker, 2010).

Araştırmacılar 2p21 kromozomal lokalizasyonunda (chr2:44,111,964-44,271,858) *PPM1B* geninin POY ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Ancak, belirtilen genin lokalizasyonunun Build GRCh37:Feb.2009, hg19 veri tabanında (chr2:44,396,000-44,436,571) bölgesinde olduğu; Ledig ve arkadaşları tarafından belirtilen lokalizasyonda *LRPPRC* (Leucine rich PPR motif-containing protein) geni olduğu gözlenmiştir. Yaklaşık aynı bölgenin bu çalışmada duplikasyonu saptanırken, bizim çalışmamızda delesyonu saptanmıştır. *LRPPRC* geni çok sayıda pentatricopeptide tekrarı olan bir lösin-zengini protein (PPR) kodlamaktadır. Proteinin kesin rolü bilinmemekle birlikte çalışmalar; hücrel iskelet organizasyonu, veziküler taşıma veya nükleer ve mitokondriyal genlerin transkripsiyonel düzenlenmesinde rol oynadığını bildirmektedir (Sasarman 2010). Olgun oositlerde her mitokondride bir adet mtDNA kopyası bulunur. Protein öncelikle mitokondriye lokalizedir ve bir N-terminal mitokondriyal hedef dizisine sahip olduğu tahmin edilmektedir. Olgun mitokondriyal mRNA'nın oluşması ve formasyonunda görevlidir. Özellikle transkripsiyonel activator PGC-1 karaciğer glikoz homeostasisinde, enerji metabolizmasında ve nükleer reseptör aktivasyonunda rol oynadığı ifade edilmektedir. Fransız-Kanadalı popülasyonunda bu gendeki mutasyonlar Leigh sendromu ile ilişkilendirilirken yüksek düzeyde ekspresyonu gastrik kanserlerde biyomarker olarak önerilmektedir. *LRPPRC* delesyonlarına ait bir bilgiye ulaşılamamıştır (Li vd., 2014). Ledig ve arkadaşları, CNV bölgelerindeki otozomal kromozomlara lokalize genlerin çoğunluğunun mayoz, DNA onarımı ya da over folikülogenez ile ilişkili genler olduğunu, reproduktif olgularda hastalığın genetik temelini oluşturmasına X kromozomu kadar, otozomal kromozomlarında katkı sağladığını bildirmişlerdir. Bizde çalışmamızda X kromozomu kadar otozomal kromozomlara lokalize, mayoz ve folikülogenez ile ilişkili olduğu bildirilen genlerinde bulunduğu CNV'ler gözlemledik.

Knauff ve arkadaşları tarafından 99 POY olgusunda yapılan çalışmada *ADAMTS19* geni POY için aday gen olarak gösterilmiştir (E. A. Knauff vd., 2009). Bizim çalışmamızda *ADAMTS* gen ailesinin bir başka üyesi olan *ADAMTS17* geninin dâhil olduğu, kromozom 15q26.3 bölgesinin 9 numaralı olguda delesyonu saptanmıştır.

ADAMTS proteinleri kendilerine birçok işlev kazandıran farklı özelleşmiş kısımlardan (Domain) oluşmuş protein ailesidir. Karaciğer sirozu patogeneğinde, embriyonik gelişimde Marfan sendromundaki ektopia lentis olayında rolü olan farklı fonksiyonel *ADAMTS* proteinleri bildirilmekle beraber *ADAMTS19* ve *ADAMTS1* proteinleri POY (Pun, Kim, Cha, & Kwack, 2014) ile ilişkilendirilmiştir (Cömertoğlu, Sarıkaya, Demirel, Akyol, & Demircan, 2014). *ADAMTS17* mutasyonlarının kısa boy ve ekstremiteler, lens dislokasyonu, zayıf cilt ve eklem hareket kısıtlılığı ile karakterize "Weil Marchesani Sendromu" ile ilişkili olduğu düşünülmektedir

(<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>). Ancak, literatür taramasında *ADAMTS17* ile ilgili verilerin henüz çok sınırlı olduğu gözlenmiştir.

Knauff ve arkadaşları tarafından 108 beyaz ırk POY olgusu ve 235 sağlıklı kontrol grubunun bulunduğu çalışmada; X kromozomuna spesifik SNP'lerin belirlenmesi amacıyla 370K CNV BeadChips array kullanılmıştır. Bu çalışmanın aynı olgu grubunda 60K array çalışmasının kontrol çalışması olarak tasarlandığı belirtilmiştir. Toplam 16 hastada Xq21 bölgesinde *PCDH11X* (protocadherin 11 X-linked) ve *TGIF2LX* (TGFB-induced factor homeobox 2-like, X-linked) genlerinin delesyonunu bildirmişlerdir. *TGIF2LX* geni erkek infertilitesi ile ilişkili olup spermatogonial kök hücrelerin düzenlenmesi ve çoğalmasında önemli rol oynamaktadır, ancak kadınlardaki rolü tanımlanmamıştır. Xp22.33 bölgesinde PAR1 (pseudoautosomal regions1): *SHOX* (short stature homeobox), *ASMTL* (N-acetylserotonin O-methyltransferase-like) ve *P2RY8* (Purinergic Receptor P2Y, G-Protein Coupled, 8) genlerini kapsayan bölgede *SHOX* genine ait 3 olguda, *ASMTL* genine ait 5 olguda, *P2RY8* genine ait 7 olguda duplikasyon bildirmişlerdir (A. Knauff, 2009; E. A. Knauff vd., 2011). Bizim çalışmamızda da bu genleri içeren bölgede 7 olguda duplikasyon saptanmıştır. *ASMTL* gen ürünü ovaryan foliküllerde yüksek ekspresyonu olan bir enzimdir. Daha sonra da anlatılacağı üzere Norling ve arkadaşları çalışmalarında *ASMTL* (%4,6) ve *P2RY8* (%6,5) genlerini POY için aday gen olarak önermişlerdir (Norling vd., 2014). Çalışmamızda kontrol popülasyonları ile yapılan karşılaştırmada, saptadığımız bu bölgeye ilişkin duplikasyonun anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği saptanmıştır.

McGuire ve arkadaşları tarafından 89 POY olgusu ile yapılan çalışmada otozomal kromozomlarda HumanCNV370-Dou DNA Analysis BeadChip ve Human 660W-Quad v1 DNA Analysis BeadChip kullanılmıştır. Kontrol popülasyonu olarak DGV verileri kullanılmıştır. ("Database of Genomic Variants," 2014a) Uzunlukları 0.1 Mb-3.4 Mb arasında toplam 198 CNV tanımlanmıştır. Altısı gen kodlayan bölgelerde olmak üzere yedi yeni mikrodelsiyon belirlenmiştir (8q24.13, 10p15-p14, 10q23.31, 10q26.3, 15q25.2 ve 18q21.32). Bu bölgelerde daha önceden knockout farelerde POY'a neden olduğu bilinen *SYCE1* ve *CPEB1* genleri bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda bu bölgelere ilişkin herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak, bu çalışmada mikroduplikasyon olarak tespit edilen 17 adet CNV bölgesinden biri olan 4p16.2 bölgesinde 0.23 Mb, bizim çalışmamızda da 9 numaralı olguda 0.30 Mb büyüklüğünde mikro duplikasyon saptanmıştır. Kontrol popülasyonunu ile yaptığımız karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak kontrol popülasyonu verileri sadece 7 olguda FISH ile yapılan analizlere ilişkin verilerdir. Kontrol popülasyon sayısının sınırlı olması nedeniyle istatistiksel olarak farklılığın gözlenmemesi beklenen bir sonuçtur. Kromozom 4p16.2 bölgesinde *MSX1* geni yer almaktadır (McGuire vd., 2011). *MSX1* geni kas segment homeobox ailesinin üyesini kodlamaktadır. Çekirdek transkripsiyon kompleksi ve diğer homeoproteinlerin interaksiyonu yoluyla embriyogenez sırasında bir transkripsiyon represörü olarak görev yapmaktadır.

Yapılan hayvan deneylerinde *MSX1*'in baskılanması durumunda oosit maturasyonunda, embriyo yarılanma oranlarında ve çeşitli genlerin ekspresyon potansiyellerinde azalma gözlenmiştir. Bu bulgular deneklerde oosit ve preimplantasyon embriyo gelişiminde önemli rolü olduğunu desteklemektedir. *MSX1* baskılanması ile transkripsiyonun DNA'ya bağlı düzenlenmesinde rol oynayan ZNF proteinlerinin, kromozom segregasyonunda görev alan *RIOK3* ve *AURKA* ekspresyonlarının da azaldığı gözlenmiştir. Tersine *MSX1* ifadesinin yüksek olduğu durumlarda da mayoz spesifik nükleer yapısal proteinlerin (*MNS1*, *LGALS3*, *IFNT*, *RPL23*, *PLAC8*) transkriptleri artmaktadır. Ayrıca memeli ovaryumlarında BMP aracılı apoptoz sinyallerinin düzenlenmesinde etkilidirler. Yüksek düzeyleri fare uterus epitelyumunda gözlenmiş ve embriyonik implantasyon sonrası uterusu koruma amacıyla düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (Teschke vd., 2010).

Norling ve arkadaşları tarafından 26 POY olgusunda 1M array-CGH platformu kullanılarak yapılan çalışmada 8 bölgede delesyon ve 5 bölgede de duplikasyon tanımlanmıştır. 15q26.2 bölgesi delesyonu, 12p13.33 bölgesi duplikasyonu bizim çalışmamızla da ortak olan kromozomal lokuslardır, ancak başlangıç ve sonlanma bp konumları açısından farklılık göstermekte ve dolayısıyla gen içerikleri de farklı olmaktadır.

Duplikasyon açısından ortak olan bir diğer kromozomal lokus Xp22.33 bölgesidir. Bu bölgeye lokalize *ASMTL* (Acetylserotonin O-methyltransferase-like) geninin POY için aday gen olabileceği vurgulanmaktadır. *ASMTL* gen ürünü, ovaryan foliküllerde yüksek ekspresyonu olan bir enzimdir. Bizim çalışmamızda da 13-14-15-17-19-21-33 numaralı olgularda *SHOX*, *ASMTL* ve *P2RY8* genlerini içeren aynı bölgenin duplikasyonu saptanmıştır. Daha öncede belirtildiği gibi Knauff ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da *SHOX*, *ASMTL* ve *P2RY8* genlerini kapsayan bölgenin duplikasyonu saptanmış ve bu genlerin POY ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Bu bağlamda bizim çalışmamız, bu genleri içeren bölge duplikasyonlarının POY ile ilişkili olabileceğini öngören üçüncü çalışmadır (Norling vd., 2014).

Tachdjian ve arkadaşları *SHOX* gen duplikasyonları ile ilgili olarak 46,XX kadınlara göre POY riskinin daha yüksek olduğunu savunmuştur. 47,XXX kadınlarda POY sıklığının yüksek olması buna bir destek olabilir. Ayrıca, Xp duplikasyonu, mayoz bölünme sırasında X kromozomu krosing overinde parça değişiminin bozulmasına ve oosit delesyonuna neden olabilir (Tachdjian vd., 2008).

Fenotip göz önüne alındığında, *SHOX* gen delesyonunun boy kısalığı ile ilişkili olduğunu bildiren çok sayıda yayın mevcuttur (Dauber, Rosenfeld, & Hirschhorn, 2014). Xp duplikasyonu ile uzun boy arasındaki ilişki halen belirsizliğini korumaktadır. Ogata ve arkadaşları, boy uzunluğunun belirlenmesinde *SHOX* protein seviyeleri ve cinsiyet steroidleri arasında karmaşık bir etkileşim olduğunu ve fenotipin farklı

olabileceğini bildirmişlerdir (Colao vd., 2013; Ogata vd., 2001). Bu belirsizliğin oluşmasına bireyler arasında X kromozomunun dozaj etkisinin fenotipe farklı yansımalarının etkili olabileceğini bildirmişlerdir (Kearney, Thorland, Brown, Quintero-Rivera, & South, 2011).

X kromozomuna ait kayıp ve kazanç anomalilerinin fenotipe yansımalarının yorumlanmasında hemizigot erkeklerde gözlenen duplikasyon ve/veya delesyonların incelenmesi daha anlamlı olacaktır. Ancak erkeklerde bazı X kromozomuna lokalize gen anomalileri letal olabilmektedir. Bu nedenle aynı gen anomalileri XX genotipte değerlendirilirken dozaj etkisi yerine fenotip dikkate alınmalıdır. X kromozomu anomalileri ile ilişkili fenotip çeşitliliğini, X kromozomu anöploidileri (47,XXY ya da 45,X) ve X-inaktivasyonu etkilemektedir (Kearney vd., 2011). Tüm bu bilgiler doğrultusunda diğer Xp lokalize genlerle birlikte *SHOX geni* duplikasyonlarının patolojik etkisinin belirlenmesi için spesifik gruplarda çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

CNV bölgeleri ve içerdikleri genler

aCGH analizi çalışmamıza dâhil edilen 55 olgunun 22'sinde (~%40) 15 CNV tespit ettik. Bu CNV bölgeleri içinde patojenik olması muhtemel CNV'ler ve genler Tablo 4.4'de özetlenmiş ve aşağıda tartışılmıştır.

Toplam 5 olguda (2-3-11-32-53) kromozom 3p13 bölgesinde yaklaşık 120 kb-192 kb büyüklüğünde delesyon saptanmıştır. Bu bölgede bulunan *FOXP1* (Forkhead Box P1) geni, forkhead/winged-helix transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir. Bu gen, gelişme sırasında doku ve hücre spesifik gen transkripsiyonunu düzenlemektedir. Knockout fare modellerinde normal doku gelişmesi varken, apoptosis yokluğu görülmüştür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda meme, over, prostat kanserlerinde bu genin ekspresyon kaybı gözlemlenmiştir. Bu bulgular *FOXP1* geninin bir tümör baskılayıcı gen olabileceğini ortaya atmıştır (Hu vd., 2014). Mutasyonlarında konuşma bozuklukları, otistik bulgular, mental retardasyon tanımlanmıştır (Le Fevre vd., 2013).

Pariani, Mitchel ve arkadaşları konuşma bozukluğu, hipertoni, kontraktürler ve BPES bulguları olan bir olguda *FOXP1* ve *FOXL2* genlerini içeren 3p14.1p13 bölgesinde 785 kb uzunluğunda delesyon tanımlamışlardır. BPES göz kapağı anomalileri, mental değişiklikler ve POY ile karakterize bir sendromdur ve *FOXL2* (3q22.3) gen değişiklikleri ile karakterizedir (Albrecht vd., 2004; Pariani, Spencer, Graham Jr, & Rimoin, 2009). Kromozom 3p13 bölgesinde saptanan delesyon ile *FOXL2* mutasyonu arasındaki ilişki, ekspresyon çalışmaları ile ortaya konabilecektir.

Çalışmamızda 5 olguda (9-15-30-32-44) kromozom 15q26.3 bölgesinde 0.74 Mb-1.38 Mb arasında büyüklüğe sahip delesyonlar saptanmıştır. Bu delesyon bölgesi içinde *PCSK6* (Proprotein Convertase

Subtilisin/Kexin Type 6) geni bulunmaktadır. *PCSK6*, folikül maturasyonun tüm aşamalarında teka hücrelerinde, erken antral aşamada, granüloza hücrelerinde eksprese edilir. Knockout fare çalışmalarında yaklaşık 9 aylık bir süreçte over morfolojisinde patoloji, folikül sayısında ciddi azalma hatta tamamen kayıp, ovaryan atrofi ve tümör oluşumuna kadar giden fenotip tanımlanmıştır. Proproteinin biyoaktivasyonu, kolesterolün, otokrin/parakrin sinyallerin düzenlenmesi, steroidegenezin, gonadotropin sinyallerinin kontrolünde meydana gelen hataların *PCSK6* gen ekspresyonundaki anomalilerden kaynaklandığı vurgulanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda overlerde doku homeostazisinin ve normal selüler yapının devamı için *PCSK6* geninin kritik rol oynadığı düşünülmektedir (Mujoomdar, Hogan, Parlow, & Nachtigal, 2011).

Kromozom 2q23.3-q24 bölgesinde yaklaşık 900 kb büyüklüğünde *NR4A2* (Nuclear Receptor Subfamily 4, Group A, Member 2) genini içeren bölgenin 2 olguda (7, 13) delesyonu gözlenmiştir. *NR4A2* geni, nükleer steroid-tiroid hormonu-retinoid reseptor ailesinin bir üyesidir. Kodlanan protein, bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Ovaryan granuloza hücreleri, follikulogenez gibi overian fonksiyonlarda önemli roller üstlenmektedirler. FSH ve LH'a yanıt olarak, granüloza hücreleri içindeki hücre içi cAMP düzeyinin yükselmesi birçok overgeninin aktivasyonuna yol açmaktadır. *NR4A* ekspresyon anomalileri ile follüküler gelişim arasındaki doğrudan ilişki Wu ve diğerleri tarafından bildirilmiştir (Wu vd., 2005).

Bir olguda (olgu no 8) kromozom 8p12 bölgesinde *NRG1* (Neuregulin) geninin dâhil olduğu bölgenin delesyonu gözlenmiştir. Ovulasyon, preovulatoz foliküllerin kümülüs ve granüloza hücreleri, LH ve aktive olmuş EGFR (ERBB1)/ERK1/2 yolağı tarafından uyarılırlar. *NRG1* (Neuregulin) geninin iki transkripti granüloza hücrelerinde eksprese olmaktadır. Ovulasyon sırasında ERK1/2 ile C/EBP β -bağımlı yollar aracılığıyla *NRG1* tip III indüklenmektedir. *NRG1* muhtemelen granüloza ve kümülüs hücrelerinde ERBB3/ERBB2 kompleksine bağlanmaktadır. Kültüre edilmiş granüloza hücrelerinde, *NRG1* selektif olarak ERK1/2'ye karşı AKT/PKB'nin fosforilasyonu ile baskılanmaktadır. Tip III *NRG1*'nin ekspresyonu ovulasyon sırasında granüloza hücrelerinde uyarılmakta ve uyarılan *NRG1* granüloza ve kümülüs hücrelerinde AREG kaynaklı ERK1/2 fosforilasyonunu gerçekleştirmektedir. Çalışmalar *NRG1* yolağının granüloza hücrelerinde AREG kaynaklı progesteron üretimi ve kümülüs bağımlı mekanizma aracılığıyla oosit maturasyonunun düzenlenmesi olmak üzere iki rolünü bildirmişlerdir (Noma vd., 2011).

NRG1 geninin fonksiyon kaybı ile ilgili hayvan deneyleri mevcuttur. *NRG1* granüloza hücre duvarında LH tarafından uyarılmaktadır. Deneylerde, kümülüs hücrelerinin protein kinaz C (PKC) ve Connexin-43 fosforilasyonuna bağlı olarak anormal düzeyde aktive olmaları sonucu erken mayotik bölünmelerin ortaya çıktığı, buna bağlı olarak fertilizasyon problemleri ile karşılaşıldığı ortaya konmuştur. *NRG1*, anormal

fertilizasyona yol açan prematür sürecin önlenmesi ve kümülüs hücrelerinde protein kinase C aktivasyonunu baskılayarak oosit olgunlaşmasında rol oynamaktadır (Kawashima vd., 2014).

Bir olguda (olgu no 31) kromozom 3q26.31'de *SPATA16* (Spermatogenesis Associated 16) geninin de bulunduğu bölgenin amplifikasyonu saptanmıştır. *SPATA16* geni spermatogenezde görevli bir genidir. Golgi aparatına lokalize protein kodlar. Sperm akrosom, sperm yumurta oluşumu ile spermatogenezde etkin rol oynamaktadır. Gen defektleri, özellikle homozigot mutasyonları "Globozoospermia" hastalığı ile ilişkilendirilmiş olup erkeklerde fertilizasyon problemlerine neden olmaktadır. Globozoospermi, akrozomun tamamen yokluğu ile karakterize sperm orta bölgesinin organizasyonunun bozuk olduğu, infertilite ile seyreden bir durumdur. Nadir görülmektedir ve genetik nedeni tam olarak belirlenmemiştir. Aşkenazi Yahudi ailesinin 6 erkek kardeşinde (üç etkilenen ve üç sağlıklı) yapılan genom tarama analizinde etkilenmiş globozoospermili üç erkek kardeşte akrozom oluşumunda önemli role sahip *SPATA16* (spermle ilişkili protein 16) geninde homozigot mutasyon tespit edilmiştir (Sermondade vd., 2011). Overlerde ise yaşla azalan ekspresyon düzeyi saptanmıştır. Ancak kadınlarda duplikasyonunu açıklayan literatüre rastlanmamıştır.

Bir olguda (olgu no 8) kromozom 16p13.3'de *AXIN1* geninin de bulunduğu bölgenin delesyonu saptanmıştır. Bu gen axin (Dixit vd., 2006)ve G protein sinyal domainlerinin düzenlenmesinde görevli bir sitoplazmik protein kodlar. Bu protein, WNT1 sinyal yolağının negatif düzenleyicisi ve apoptatik uyarıcısıdır. Mutasyonları hepatoselüler karsinoma, hepatoblastomalar, ovarian endometrioid adenokarkinomalar ve medullablastomalar ile ilişkilendirilmiştir. Gen ürünü, insan kümülüs hücreleri gelişme sürecinde WNT/{beta}-CATENIN sinyal yolağının baskılanmasında tümör baskılayıcı protein olarak tanımlanmıştır (H.-X. Wang, Tekpetey, & Kidder, 2009).

Bir olguda (olgu no 1) kromozom 12p13.33 bölgesinde yaklaşık 300 kb büyüklüğünde amplifikasyon saptanmıştır. *ADIPOR2* (Adiponectin Reseptör2) gen ürünü, Progesteron ve AdipoQ reseptör ailesinin bir üyesi olan, insülin sentezleyen, antiinflamatuvar ve antiterojenik özellikleri olan adiposit kaynaklı bir plazma proteindir. İnsülin direnci ve obezite arttıkça adiponektin düzeyleri azalmaktadır. Bu nedenle adiponektin düzeylerinin düşüklüğü metabolik sendrom ve tip 2 diyabet için bağımsız risk faktörleridir. Adiponektinin insülin direncini düzeltici etkisi vardır.

İnsülin, endojen androjenin üretimini artırmaktadır. Periferik direnç arttığı takdirde insülin artarak IGF-1 reseptörlerine bağlanmakta ve teka hücrelerinden androjen üretimini uyarmaktadır. Karaciğerden IGF bağlayıcı protein-I (IGFBP-I) salgılanmasını düşürerek ovaryan foliküllerin olgunlaşması ve steroidogenezde düzenleyici rolü olan IGF-1 ve IGF-2'nin artmasına neden olmaktadır. İnsülin, ayrıca over ve adrenal bezlerden

steroid hormon sentezlenmesinden sorumlu sitokrom p-450c enziminin etkisini arttırmakta ve bu nedenle androjen düzeyleri artmaktadır. Overlerdeki androjen artışı, foliküler atrezinin gerçekleşmesine ve ovulasyonun baskılanmasına neden olmaktadır.

Bir olguda (olgu no 4) kromozom 16q24.3 bölgesinde yaklaşık 345 kb büyüklüğünde *FANCA* (Fanconi Anemia, Complementation Group A) ve *SPIRE2* (spire-type actin nucleation factor 2) genlerini içine alan bölgenin delesyonu saptanmıştır. *FANCA* proteini lenfoid doku, testis ve overlerde eksprese olmaktadır. *FANCA* geninin bozulması; büyüme geriliği, primordial germ hücre hipoplazisi, mayotik defektler ve mikroftalmiye neden olmaktadır. Koreli 98 POY ve 128 kontrol bireyinde yapılan polimorfizm çalışmasında *FANCA* genine ait POY ile ilişkili iki polimorfizm bulgusu rapor edilmiştir (Pyun vd., 2015).

SPIRE2 geni, yeni filamentlerin yavaş büyüyen uçları ile ilişkili olan actin çekirdeklenme faktörü olarak işlev göstermektedir. Aktin iskeleti dinamikleri ve intraselüler transport arasındaki yeni bağlantıları sağlayarak aktin lifleri boyunca intraselüler vezikül transportundan sorumludur. *SPIRE2*, aynı zamanda mayoz bölünme sırasında asimetric iş pozisyonunun sağlanması ve asimetric hücre bölünmesi için gereklidir. Oosit mayoz bölünmesi sürecinde normal yarıma çizgisinin oluşumu ve polar cisimciğinin çıkarılması için *SPIRE2* geninin gerekli olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Pfender, Kuznetsov, Pleiser, Kerkhoff, & Schuh, 2011). Hayvan deneylerinde oogenez ve oosit maturasyonda polaritenin ve asimetricin sağlanmasında *SPIRE2* geninin aktif fonksiyon göstermesi gerektiği bildirilmiştir (Kloc, Ghobrial, Borsuk, & Kubiak, 2012).

Bir olguda (olgu no 9) kromozom 16p13.3 bölgesinde yaklaşık 398 kb büyüklüğünde önceden *PDK1* olarak da bilinen *PDPK1*(3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1) geninin bulunduğu bölgenin amplifikasyonu saptanmıştır. Gonadotropin bağımlı ve gonadotropin bağımsız foliküler rezervin düzenlenmesinde, folikül büyümesi, folikül büyümesinin aktivasyonu, germ hücre sağ kalımı *PTEN/PI3K/PDPK1/AKT1*(phosphatase and tensin homolog /phosphatidylinositol-3 kinase/3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 /v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) ve BMP/AMH/SMAD (the bone morphogenetic protein/anti-Müllerian hormone /SMAD) sinyal yollarının düzenlenmesi ile gerçekleşmektedir. Bu yollar; insulin, insulin-benzeri büyüme faktörleri (IGF), KIT ligand gibi sitokinleri, hormonları, büyüme faktörlerini aktive etmektedirler. Bu faktörler, somatik ovaryan hücreleri ve germ hücrelerinin farklılaşması ve sağ kalımında düzenleyici etki göstermektedirler. Bu yollarda sinyal etkileyicilerini, ligandları ve reseptörleri kodlayan genlerin herhangi birinde meydana gelen değişiklik ovaryan rezerv oranının düşmesine ve buna bağlı olarak da POY'a neden olmaktadır (Monniaux vd., 2014).

Bir olguda (olgu no 3) Xq21.2 - q21.31 kromozomal bölgesinde *KLHL4*, *CPXCR1* genlerini içeren yaklaşık 2,1 Mb büyüklüğünde delesyon saptanmıştır. Cherokive arkadaşları tarafından 14 müllerian agenezi olgusunun dâhil edildiği 1Mb tüm genom BAC arrayCGH çalışmasında Xq21.31 kromozomal lokusunda *KLHL4* (Kelch-Like Family Member 4) geninin de bulunduğu yaklaşık 1 Mb'lık bir delesyon rapor edilmiştir. Bu gen, yaygın olarak fetal dokularda eksprese olmaktadır. Kadın üreme sistemi ile ilişkilendirilmiş olmakla birlikte işlevleri kesin olarak ortaya konamamıştır. Meydana gelen delesyonun, POY ve organogenez ile ilişkilendirilen *DACH2* ve *POFB1* genlerine olan komşuluğu olası bir mekanizma olarak (yer durumu etkisi) sunulmuştur (Cheroki vd., 2008).

Yine aynı olgumuzda aynı bölgedeki *CPXCR1* (CPX Chromosome Region, Candidate 1) geninin delesyonu saptanmıştır. Bu gen X kromozomal yarık damak (CPX) hastalığı ile ilişkili birkaç genden biridir. Flavio, 25 POY olgusunun dâhil edildiği çalışmasında 2 olguda 46,X,t(X;3)(q21.2;q12) ve 46,X,t(X;12)(q21;p13) karyotipi bildirmiştir. Bu yeniden düzenlenmelerin kırık bölgesinin *CPXCR1* genini kapsayan Xq21 lokalizasyonunda bulunduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu olgularda gözlenen POF fenotipinin kromozomal lokusa bağlı pozisyon etkisinin bir sonucu olabileceğini bildirmişlerdir. Bu delesyonun olduğu bölge OMİM (300511)'de POF2 bölgesi ile komşuluk göstermektedir (Rizzolio vd., 2006).

Bir olguda (olgu no 24), kromozom 10q21.3 bölgesinde yaklaşık 165 kb büyüklüğündeki bölgenin amplifikasyonu saptanmıştır. *SIRT1* geni NAD + bağımlı sınıf III deasetilaz enzimler olarak bilinen Sirtuin (SIRT) ailesinin yedi üyesinden biridir. Metabolizmanın düzenlenmesi, yaşlanma, kanser ve hücre yaşamı gibi hücresel işlevlerde önemli roller üstlenmiş bir ailedir. İnsan luteinize granüloza hücrelerinde ekspresyonu vardır. *SIRT1* hücre yaşamı ve apoptik yolların da dâhil olduğu geniş çaplı hücresel süreçler içerisinde transkripsiyon faktörlerini hedefleyerek gen ifadesinde, histon proteinlerinin deasetilasyonunda rol oynamaktadır. Histon olmayan TAFI68 proteini deasetilasyonunda da etkilidir. DNA bağlayıcı faaliyetini düşürerek RNA Pol-I aracılığıyla transkripsiyonun baskılanmasına öncülük etmektedir. *SIRT1*, sınırlayıcı transkripsiyon faktörü olan p300'u bağlamakta ve deasetile etmektedir. p300 proteininin engellenmesi hücre farklılaşmasının ve metabolizmasının düzenlenmesinde etkilidir. *SIRT1*; p53, p73, E2F, HIC1 ve Ku70 gibi proteinleri hedefleyerek, deasetilize ve transkripsiyonel faaliyetlerinin baskılanması yoluyla apoptozu engellemektedir. Hayvan deneylerinde *SIRT1*'in organizmada insülin/IGF yoluna etki ederek yaşlanmayı azalttığı ve strese dayanıklılığı arttırdığı gözlenmiştir. Üremede gelişmekte olan spermatozoidlerin daha yüksek seviyelerde *SIRT1* ifade ettiği ve *SIRT1* gen delesyonlarında farede anlamlı düzeyde sperm anomalisine ve infertiliteye neden olduğu gözlenmiştir. Aşırı *SIRT1* ifadesi ise, DNA'da, radyasyondan kaynaklanan zincir kırılmalarında artışa sebebiyet vermektedir (Bayram & İçci, 2013).

Çalışmalarda obesitenin oosit kalitesini etkilediği bildirilmiştir. Hayvan deneylerinde obeseite, ovaryan folikül gelişmesini hızlandırmakta, foliküler aktivasyonları etkileyerek foliküllerin erken tükenmesine neden olmaktadır. *SIRT1* aktivatörü SRT1720 kullanılarak mTOR yolu üzerinden folikül ömrünün ve kalitesinin arttırıldığı ve obeseiteye karşı folikül havuzunun düzenlendiği bildirilmiştir (N. Wang vd., 2014). *SIRT1* ve AMPK gibi metabolik sensörler, mTOR and insulin/IGF-1 aracılığıyla enerji alımı ve hücrel büyüme kontrol etmektedirler. Obesite ve yaş NAD⁺/NADH and AMP/ATP oranlarını azaltırken, diyet ters yönde etkili olmaktadır. PGC-1 α and FOXO transkripsiyonel düzenleyicilerinin etkisiyle mitokondriyal fonksiyon ve stress rezistansı artmaktadır. Bu mekanizmada ortaya çıkan bozukluklar ise yetersiz mitokondriyal fonksiyona neden olmakta, buna bağlı olarak oositlerde ATP miktarı azalmakta ve mayotik maturasyonun dolayısıyla fertilitenin bozulmasına neden olmaktadır (Tilly & Sinclair, 2013).

Diğer yandan Zhao ve arkadaşları, *SIRT1* geninin ekspresyonunun artmasına neden olan resveratrol vererek yaptıkları hayvan çalışmasında granüloza hücrelerinde Bax, Caspase-3 ve inhibitor *Bcl-2* aracılı apoptozun arttığını, *Bcl-2* miktarının düştüğünü belirlemişlerdir. Normal koşullarda *Bcl-2* geninin aktivasyonu, primordial foliküllerde apoptozisi azaltmaktadır. Ancak foliküler atrezinin hızlanması sırasında *SIRT1* mRNA düzeyleri düşük olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle *SIRT1*'in granüloza hücrelerinde apoptotik rolü net değildir (F. Zhao vd., 2014).

Granüloza hücrelerinin formasyonunda *FOXL2* ile *SIRT1*'in ters etkili bir düzenleme mekanizması vardır. *SIRT1* apoptozisi aktive eden *FOXL2*'nin etkisini baskılamaktadır. *SIRT1*'in anormal düzeylerdeki artışı granüloza formasyonun bozulmasına, azalmaları ise apoptozisin artmasına dolayısıyla folikül atrezisinde hızlanmaya neden olmaktadır. Benayoun ve Berenice A. granuloza hücrelerinde yaptıkları çalışmada, apoptozis fonksiyonunu baskılayan *SIRT1*'i nicotinamide aracılığıyla baskılamışlardır. Sonuçta granüloza hücrelerinin homeostazisinin sağlanmasında önemli rolü olan *FOXL2*'nin, ovaryan tümör ogenezis sürecinin önlenmesinde etkili olduğunu bildirmişlerdir (Benayoun vd., 2011).

Aynı amplifikasyon bölgesinde bulunan *HERC4* geni ile ilgili olarak hayvan deneylerinde azalan sperm motilitesi ve infertilite bildirilmiştir (Rodriguez & Stewart, 2007).

Bir olguda (olgu no 30) kromozom 7p22.3 bölgesinin yaklaşık 1.1 Mb büyüklüğünde delesyonu saptanmıştır. *SUN1* (Sad1 And UNC84 Domain Containing 1) geni bir UNC84 (SUN) domeini ile nükleer zarf proteini kodlamaktadır. Protein, nükleer destek ve migrasyon ile ilişkilidir. Mayoz bölünmede homolog kromozomlar arasında rekombinasyon ve parça eşleşmesinden önce telomerler nükleer zarfa eklenmekte ve geçici küme oluşturulmaktadır. *SUN1*, bu sürece aracılık eden mayoz aracılı proteindir. *SUN1*, mayotik profaz 1 sırasında leptoten ve diploten aşamaları arasında

telomerler ile özellikle ilişkilidir. Knockout fare modellerinde *SUN1* geni mutasyonuna bağlı olarak protein üretiminin bozulması veya olmaması sonucu mayozda sinapsis ve homolog parça değişimi ile nükleer zarfa telomerlerin bağlanması süreçlerinin etkilendiği gözlenmektedir. Bu nedenle; *SUN1* gametogenezde homolog kromozomlar arasındaki parça değişimi/sinapsis oluşumu ve dinamik telomer hareketlerinin olması için gerekli bir proteindir. Mutant gonadlarda apoptotik olaylar uyarılmakta ve oogenez yıkımı gerçekleşmektedir (Ding vd., 2007).

Bir olguda (olgu no 4) kromozom 2q21.2 bölgesinde yaklaşık 400 kb büyüklüğünde *MPV17*, *UCN*, *EIF2B4* genlerinin de bulunduğu bölgenin delesyonu saptanmıştır. *MPV17* (MpV17 Mitochondrial Inner Membrane Protein) geni reaktif oksijen metabolizmasından sorumlu iç membran proteini kodlamaktadır. Mutasyonları, mitokondrial DNA deplesyon sendromlarının (MDDS) hepatoserebral formu ile ilişkilidir.

Yumurtalık fonksiyonunun mitokondriyal DNA tükenmesi rolü çalışılmamıştır, ancak erken over yetmezliği olan kadınların kanında düşük mitokondriyal DNA içeriği bildirilmiş ve aynı yolakta görevli *POLG* mutasyonları ile prematür over yetmezliği ve mitokondriyal DNA tükenmesi ilişkili bulunmuştur. Prematür over yetmezliği olan kadınlarda mitokondriyal tükenme sendromlarının hafif formları gözlenebilmektedir. Bu nedenle olgularda tipik hepatoserebral semptomlar beklenmeksizin sinir sistemi ya da karaciğer hastalığı ile bulgular ortaya çıkarsa mitokondriyal hastalıkların için değerlendirilmesi düşünülmelidir (Mendelsohn vd., 2013).

UCN (urocortin) geni, sauvagine / kortikotropin-salıcı faktör / ürotensin 1 ailesinin bir üyesidir. Beyinde iştah üzerindeki stresin etkilerinden sorumlu olabilir. Overlerde ürokortin Kortikotropin-Salıcı Faktör (CRF) Reseptörü ekspresyonu bulunmaktadır. CRF, ovaryan steroidogenezi baskılamaktadır. Lokal olarak ürokortin, steroidojenik luteal hücrelerinde sentezlenen ve özellikle luteal regresyon sırasında, ovaryan steroidogenezin bir otokrin ve/veya parakrin düzenleyicisi olarak etkilidir.

EIF2B4 (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B, subunit 4) geni protein sentezinin ilk adımı olan ökaryotik başlatıcı faktör 2B'yi kodlamaktadır. Beyinde beyaz cevherin dejenerasyonu ve POY ile karakterize nadir rastlanan Ovariölökodistrofi hastalığı olan 7 olguda mutasyonları tanımlanmıştır. POY için mekanizma ovaryan foliküllerdeki apoptozis artışı olarak gösterilmiştir (Fogli vd., 2003).

Sonuç olarak, çalışmamızda saptanan CNV bölgelerinde lokalize genler çok çeşitlidir. Bu genlerin bazılarının POY ile ilişkisi diğer çalışmalarda da ortaya konmuştur. Ancak çalışmamızda yeni saptanan bölgelerde lokalize olan genlere ilişkin ekspresyon ve fonksiyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi ile POY olgularındaki etkileri ortaya konabilecektir.

6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Sitogenetik olarak normal kromozom kuruluşuna sahip 55 olgunun aCGH analizlerinde, 22 olguda kopya sayısı değişimleri saptanmıştır. Bu CNV'lerin değerlendirilmesinde The Database of Genomic Variants (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) veri tabanı kontrol popülasyonu olarak kullanılmıştır. Polimorfizm olarak tanımlanmayan 9 delesyon, 4 duplikasyon ve 2 tane de aynı bölgede del/dup olmak üzere 15 CNV saptanmıştır. Literatür ile uyumlu olarak POY olgularında daha çok delesyonların olduğu dikkati çekmektedir. Anomali saptanan toplam 22 olgunun 5 tanesinde 15q26.3 bölgesi delesyonu ve 6 tanesinde Xp22.33 bölgesi amplifikasyonu gözlenmiş olup, toplam 11 olguya ait bu değişiklikler FISH yöntemi kullanılarak konfirme edilmiştir.

Çalışmamızda saptanan CNV'lerin multipleks ligasyon-bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA), metafaz FISH ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) gibi diğer yöntemler kullanılarak doğrulama çalışmaları yapılmasına ihtiyaç vardır. Arraylerin kendi kendilerini doğrulama özellikleri olmasına karşın hibridizasyon hataları, ilgili bölgenin GC bazları açısından zengin olması sonucu denatürasyon hibridizasyon problemleri ile karşılaşabilmektedir.

Daha önceki çalışmalarda aday gen olarak gösterilen *ASMTL*, *P2RY8*, *SHOX* ve *MSX1* genlerinin lokalize olduğu bölgelere ilişkin CNV'ler bizim olgularımızda da saptanmıştır.

Çalışmamızda POY olgularında yeni CNV bölgeleri de gözlenmiştir. Bu bölgelerde lokalize olan, oosit ve folikülogenez sürecinde fonksiyon gösterdiği bildirilen *PCSK6*, *NR4A2*, *NRG1*, *SPIRE2*, *PDPK1*, *KLHL4* ve *SIRT1* genlerinin POY kliniği ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan olgu çalışmaları ile hayvan deneylerinde, bu genlerin fonksiyonlarının bozulduğu durumlarda oogenezin olumsuz etkilenmesi, germ hücrelerinin büyük oranda depleksyonu, ovarian foliküllerin yapısal ve fonksiyonel olarak düzensizlikleri ve infertilitenin gözlenmesi etkileri nedeniyle bu genler, çalışmamızda POY için aday gen olarak önerilmektedir. Bu genlere ilişkin ekspresyon ve fonksiyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi ile POY olgularındaki etkileri ortaya konabilecektir.

Deneyimlerimiz doğrultusunda, patolojik CNV'lerin tespit edilmesinde öncelikle bunların polimorfizm olup olmadığının değerlendirilmesi gerekmektedir. Gerçek CNV ise, değişimin etkilenmiş ebeveyninden gelmesi veya *de novo* olması, *de novo* ise değişimin klinik etkilerinin değişimin büyüklüğüne, içerdiği genlerin sayısı ve patojenitesine, klinik bir fenotip ile ilişkilendirilip ilişkilendirilmediğine dikkat edilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda iki olgunun (15 ve 32) ebeveyn analizinde, üç adet delesyon içeren CNV bölgesinin *de novo* olduğu görülmüştür.

POY'un genetik zeminin belirlenmesine yönelik çalışmalar tanının erken konulmasına, dolayısıyla çocuk sahibi olma ve bu dönemde geçirilecek uzun zaman dönemine yönelik hormon replasman tedavilerinin erken dönemde planlamasına katkıda bulunacaktır. Bu nedenle herhangi bir değişiklik saptanmayan olgularda mevcut fenotipin genetik zeminin araştırılması için çalışmanın devamı olarak POY'da mutasyon oranı %5-12 olan *BMP15*, *GDF9*, *NOBOX*, *INHA* genleri ile tüm genomun mutasyonlar açısından değerlendirilmesi, kopya sayısı değişikliğine neden olmayan ancak pozisyon etkisine bağlı olarak etkili olabilen varsa inversiyon kaynaklı anomalilerin belirlenebilmesi amacıyla POY tanısı almış aile bireylerinde ve daha geniş olgu gruplarında daha yüksek rezolüsyonlu genomik tarama, yeni nesil dizileme ve ekspresyon analizlerinden yararlanılması gerektiği düşüncesindeyiz. Bu çalışmalar, POY etiyolojisinde genetik katkının oranını ve görülme sıklığının belirlenmesi açısından katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aboura, A., Dupas, C., Tachdjian, G., Portnoi, M.-F., Bourcigaux, N., Dewailly, D., . . . Donadille, B. (2009). Array comparative genomic hybridization profiling analysis reveals deoxyribonucleic acid copy number variations associated with premature ovarian failure. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(11), 4540-4546.
- Albrecht, A. N., Kornak, U., Böddrich, A., Süring, K., Robinson, P. N., Stiege, A. C., . . . Mundlos, S. (2004). A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions. *Human molecular genetics*, 13(20), 2351-2359.
- Alici-Davutoglu, E., Akhan, S., Bastu, E., Gungor-Ugurlucan, F., Iyibozkurt, A. C., & Topuz, S. (2013). Impact of premature ovarian failure and hormone replacement therapy on androgens and bone mineral density in karyotypically normal (46,XX) patients. *MINERVA ORTOPEDICA E TRAUMATOLOGICA*, 64(1), 89-96.
- Anasti, J., Kimzey, L., Defensor, R., White, B., & Nelson, L. (1994). A controlled study of danazol for the treatment of karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *Fertility and sterility*, 62(4), 726-730.
- Ayed, W., Amouri, A., Hammami, W., Kilani, O., Turki, Z., Harzallah, F., . . . Slama, C. B. (2014). Cytogenetic abnormalities in Tunisian women with premature ovarian failure. *Comptes rendus biologies*, 337(12), 691-694.
- Baltus, A. E., Menke, D. B., Hu, Y.-C., Goodheart, M. L., Carpenter, A. E., de Rooij, D. G., & Page, D. C. (2006). In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nature genetics*, 38(12), 1430-1434.
- Bambang, K., Metcalfe, K., Newman, W., & McFarlane, T. (2011). Fragile X syndrome: an overview. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 13(2), 92-97.
- Baronchelli, S., Conconi, D., Panzeri, E., Bentivegna, A., Redaelli, S., Lissoni, S., . . . Sala, E. (2011). Cytogenetics of premature ovarian failure: an investigation on 269 affected women. *BioMed Research International*, 2011, 1-2.
- Baronchelli, S., Villa, N., Redaelli, S., Lissoni, S., Saccheri, F., Panzeri, E., . . . Sala, E. (2012). Investigating the role of X chromosome breakpoints in premature ovarian failure. 4-6.
- Bayram, A., & İğci, M. (2013). Sirtuin Genleri ve İşlevleri. *Firat Tıp Dergisi*, 18(3), 136-138.
- Beke, A., Piko, H., Haltrich, I., Csomor, J., Matolcsy, A., Fekete, G., & Karcagi, V. (2013). Molecular cytogenetic analysis of Xq critical regions in premature ovarian failure. *Molecular cytogenetics*, 6(1), 62.
- Benayoun, B. A., Georges, A. B., L'Hôte, D., Andersson, N., Dipietromaria, A., Todeschini, A.-L., . . . Veitia, R. A. (2011). Transcription factor FOXL2 protects granulosa cells from stress and delays cell cycle: role of its regulation by the SIRT1 deacetylase. *Human molecular genetics*, 20(9), 1673-1686.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Bennett, C. E., Conway, G. S., Macpherson, J. N., Jacobs, P. A., & Murray, A. (2010). Intermediate sized CGG repeats are not a common cause of idiopathic premature ovarian failure. *Human reproduction*, 25(5), 1335-1338.
- Bertini, V., Ghirri, P., Bicocchi, M. P., Simi, P., & Valetto, A. (2010). Molecular cytogenetic definition of a translocation t (X; 15) associated with premature ovarian failure. *Fertility and sterility*, 94(3), 1097. e1095-1097. e1098.
- Bhangoo, A., Buyuk, E., Oktay, K., & Ten, S. (2007). Phenotypic features of 46, XX females with StAR protein mutations. *Pediatric endocrinology reviews: PER*, 5(2), 633-641.
- Bouilly, J., Bachelot, A., Broutin, I., Touraine, P., & Binart, N. (2011). Novel NOBOX loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Human mutation*, 32(10), 1108-1113.
- Britannica, E. (2013). *Encyclopaedia Britannica*: London: Encyclopaedia Britannica (UK) Ltd.
- Bussani, C., Papi, L., Sestini, R., Baldinotti, F., Bucciantini, S., Bruni, V., & Scarselli, G. (2004). Premature ovarian failure and fragile X premutation: a study on 45 women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 112(2), 189-191.
- Caburet, S., Arboleda, V. A., Llano, E., Overbeek, P. A., Barbero, J. L., Oka, K., . . . García-Tuñón, I. (2014). Mutant cohesin in premature ovarian failure. *New England Journal of Medicine*, 370(10), 943-949.
- Caburet, S., Zavadakova, P., Ben-Neriah, Z., Bouhali, K., Dipietromaria, A., Charon, C., . . . Christin-Maitre, S. (2012). Genome-wide linkage in a highly consanguineous pedigree reveals two novel loci on chromosome 7 for non-syndromic familial premature ovarian failure. *PloS one*, 7(3), e33412.
- Can, L., Fang, F., Xin, Y., Yi-min, S., & Dong-zhi, L. (2011). Analysis of Chinese women with primary ovarian insufficiency by high resolution array-comparative genomic hybridization. *Chinese Medical Journal*, 124(11), 1739.
- Ceylaner, G., Altinkaya, S. O., Mollamahmutoglu, L., & Ceylaner, S. (2010). Genetic abnormalities in Turkish women with premature ovarian failure. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 110(2), 122-124.
- Chand, A., Harrison, C., & Shelling, A. (2010). Inhibin and premature ovarian failure. *Human reproduction update*, 16(1), 39-50.
- Chatterjee, S., Singh, R., Kadam, S., Maitra, A., Thangaraj, K., Meherji, P., & Modi, D. (2009). Longer CAG repeat length in the androgen receptor gene is associated with premature ovarian failure. *Human reproduction*, 29(6), 1263-1268.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Chen, B., Suo, P., Wang, B., Wang, J., Yang, L., Zhou, S., . . . Cao, Y. (2011). Mutation analysis of the WNT4 gene in Han Chinese women with premature ovarian failure. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1), 75.
- Cheng, D.-H., Tan, Y.-Q., Di, Y.-F., Li, L.-Y., & Lu, G.-X. (2009). Crypt Y chromosome fragment resulting from an X; Y translocation in a patient with premature ovarian failure. *Fertility and sterility*, 92(2), 828. e823-828. e826.
- Cheroki, C., Krepischi-Santos, A. C., Szuhai, K., Brenner, V., Kim, C. A., Otto, P. A., & Rosenberg, C. (2008). Genomic imbalances associated with müllerian aplasia. *Journal of medical genetics*, 45(4), 228-232.
- Colao, E., Granata, T., Vismara, M. F., Bombardiere, F., Nocera, D., Luciano, E., . . . Malatesta, P. (2013). A Case of Premature Ovarian Failure in a 33-Year-Old Woman. *Case reports in genetics*, 2013, 3-4.
- Cordts, E. B., Christofolini, D. M., dos Santos, A. A., Bianco, B., & Barbosa, C. P. (2011). Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. *Archives of gynecology and obstetrics*, 283(3), 635-643.
- Coulam, C. B., Adamson, S. C., & Annegers, J. F. (1986). Incidence of premature ovarian failure. *Obstetrics & Gynecology*, 67(4), 604-606.
- Cox, L., & Liu, J. H. (2014). Primary ovarian insufficiency: an update. *International journal of women's health*, 6, 235.
- Cömertoğlu, İ., Sarıkaya, E., Demirel, M., Akyol, S., & Demircan, K. (2014). ADAMTS Gen Ailesinin Obstetrik ve Jinekolojideki Yeri. *Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*, 11(4).
- Dam, A. H., Kosciński, I., Kremer, J. A., Moutou, C., Jaeger, A.-S., Oudakker, A. R., . . . van Bokhoven, H. (2007). Homozygous Mutation in *SPATA16* Is Associated with Male Infertility in Human Globozoospermia. *The American Journal of Human Genetics*, 81(4), 813-820.
- Database of Genomic Variants. (2014a, October 2014). from <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>
- Database of Genomic Variants. (2014b).
- Dauber, A., Rosenfeld, R. G., & Hirschhorn, J. N. (2014). Genetic Evaluation of Short Stature. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(9), 3080-3092.
- De Vos, M., Devroey, P., & Fauser, B. C. (2010). Primary ovarian insufficiency. *The Lancet*, 376(9744), 911-921.
- Demirhan, O., Türkmen, S., Schwabe, G., Soyupak, S., Akgül, E., Taştemir, D., . . . Lehmann, K. (2005). A homozygous BMP1B mutation causes a new subtype of acromesomelic chondrodysplasia with genital anomalies. *Journal of medical genetics*, 42(4), 314-317.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Di Pasquale, E., Beck-Peccoz, P., & Persani, L. (2004). Hypergonadotropic Ovarian Failure Associated with an Inherited Mutation of Human Bone Morphogenetic Protein-15 (< i> BMP15</i>) Gene. *The American Journal of Human Genetics*, 75(1), 106-111.
- Di Pasquale, E., Rossetti, R., Marozzi, A., Bodega, B., Borgato, S., Cavallo, L., . . . Sacco, M. (2006). Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(5), 1976-1979.
- Ding, X., Xu, R., Yu, J., Xu, T., Zhuang, Y., & Han, M. (2007). SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Developmental cell*, 12(6), 863-872.
- Dixit, H., Rao, K., Padmalatha, V., Kanakavalli, M., Deenadayal, M., Gupta, N., . . . Singh, L. (2006). Mutational analysis of the betaglycan gene-coding region in susceptibility for ovarian failure. *Human reproduction*, 21(8), 2041-2046.
- Du, J., Zhang, W., Guo, L., Zhang, Z., Shi, H., Wang, J., . . . He, L. (2010). Two< i> FSHR</i> variants, haplotypes and meta-analysis in Chinese women with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Molecular genetics and metabolism*, 100(3), 292-295.
- Dudding, T., Lawrence, O., Winship, I., Froyen, G., Vandewalle, J., Scott, R., & Shelling, A. (2010). Array comparative genomic hybridization for the detection of submicroscopic copy number variations of the X chromosome in women with premature ovarian failure. *Human reproduction*, 25(12), 3159-3160.
- Etem, E., Kuyucu, F., Ardıçoğlu, A., & Yüce, H. (2006). İnfertilite ve Anormal Semen Analizleri Gösteren Erkeklerde FSHR Ala189Val Gen Polimorfizminin Analizi. *Firat Tip Dergisi*, 11(1), 33-35.
- Fierabracci, A., Bizzarri, C., Palma, A., Milillo, A., Bellacchio, E., & Cappa, M. (2012). A novel heterozygous mutation of the AIRE gene in a patient with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome (APECED). *Gene*, 511(1), 113-117.
- Fogli, A., Gauthier-Barichard, F., Schiffmann, R., Vanderhoof, V. H., Bakalov, V. K., Nelson, L. M., & Boespflug-Tanguy, O. (2004). Screening for known mutations in EIF2B genes in a large panel of patients with premature ovarian failure. *BMC women's health*, 4(1), 8.
- Fogli, A., Rodriguez, D., Eymard-Pierre, E., Bouhour, F., Labauge, P., Meaney, B. F., . . . Boespflug-Tanguy, O. (2003). Ovarian failure related to eukaryotic initiation factor 2B mutations. *The American Journal of Human Genetics*, 72(6), 1544-1550.
- Fonseca, D. J., Garzón, E., Lakhal, B., Braham, R., Ojeda, D., Elghezal, H., . . . Laissue, P. (2012). Screening for mutations of the< i> FOXO4</i> gene in premature ovarian failure patients. *Reproductive biomedicine online*, 24(3), 339-341.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Fonseca, D. J., Ojeda, D., Lakhal, B., Braham, R., Eggers, S., Turbitt, E., . . . Zacharin, M. (2012). < i> CITED2</i> mutations potentially cause idiopathic premature ovarian failure. *Translational Research*, 160(5), 384-388.
- Fortuño, C., & Labarta, E. (2014). Genetics of primary ovarian insufficiency: a review. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 1-13.
- Fritz, M. A., & Speroff, L. (2011). *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*: Lippincott Williams & Wilkins.
- Gao, F., Zhang, J., Wang, X., Yang, J., Chen, D., Huff, V., & Liu, Y. (2013). Wt1 functions in ovarian follicle development by regulating granulosa cell differentiation. *Human molecular genetics*, 423.
- Geckinli, B., Toksoy, G., Sayar, C., Soylemez, M., Yesil, G., Aydın, H., . . . Devranoglu, B. (2014). Prevalence of X-aneuploidies, X-structural abnormalities and 46, XY sex reversal in Turkish women with primary amenorrhea or premature ovarian insufficiency. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 182, 211-215.
- Ghadami, M., El-Demerdash, E., Salama, S., Binhazim, A., Archibong, A., Chen, X., . . . Al-Hendy, A. (2010). Toward gene therapy of premature ovarian failure: intraovarian injection of adenovirus expressing human FSH receptor restores folliculogenesis in FSHR (-/-) FORKO mice. *Molecular human reproduction*, 16(4), 241-250.
- Gleicher, N., Weghofer, A., & Barad, D. H. (2011). Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging.
- Gleicher, N., Weghofer, A., Oktay, K., & Barad, D. (2009). Do etiologies of premature ovarian aging (POA) mimic those of premature ovarian failure (POF)? *Human reproduction*, 24(10), 2395-2400.
- Goldenberg, R., Grodin, J., Rodbard, D., & Ross, G. (1973). Gonadotropins in women with amenorrhea. The use of plasma follicle-stimulating hormone to differentiate women with and without ovarian follicles. *American journal of obstetrics and gynecology*, 116(7), 1003.
- Goswami, D., & Conway, G. S. (2005). Premature ovarian failure. *Human reproduction update*, 11(4), 391-410.
- Gubbels, C. S., Land, J. A., & Rubio-Gozalbo, M. E. (2008). Fertility and impact of pregnancies on the mother and child in classic galactosemia. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 63(5), 334-343.
- Günyeli, İ. (2009). Prematür Ovaryan Yetmezlik. *Medical Network Actual Medicine*, 17(12), 27-30.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Hagerman, R. J., & Hagerman, P. J. (2002). The fragile X premutation: into the phenotypic fold. *Current opinion in genetics & development*, 12(3), 278-283.
- Harris, S., Chand, A., Winship, I., Gersak, K., Aittomäki, K., & Shelling, A. (2002). Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Molecular human reproduction*, 8(8), 729-733.
- Hens, L., Devroey, P., Waesberghe, L. V., Bonduelle, M., Van Steirteghem, A., & Liebaers, I. (1989). Chromosome studies and fertility treatment in women with ovarian failure. *Clinical genetics*, 36(2), 81-91.
- Hu, Z., Zhu, L., Tan, M., Cai, M., Deng, L., Yu, G., . . . Lin, B. (2014). The expression and correlation between the transcription factor FOXP1 and estrogen receptors in epithelial ovarian cancer. *Biochimie*.
- Jacobsen, B. K., Knutsen, S. F., & Fraser, G. E. (1999). Age at natural menopause and total mortality and mortality from ischemic heart disease: the Adventist Health Study. *Journal of clinical epidemiology*, 52(4), 303-307.
- Jin, M., Yu, Y., & Huang, H. (2012). An update on primary ovarian insufficiency. *Science China Life Sciences*, 55(8), 677-686.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.-P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., & Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258(5083), 818-821.
- Kasipillai, T., MacArthur, D. G., Kirby, A., Thomas, B., Lambalk, C. B., Daly, M. J., & Welt, C. K. (2013). Mutations in eIF4ENIF1 Are Associated With Primary Ovarian Insufficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(9), E1534-E1539.
- Kawashima, I., Umehara, T., Noma, N., Kawai, T., Shitanaka, M., Richards, J. S., & Shimada, M. (2014). Targeted disruption of Nrg1 in granulosa cells alters the temporal progression of oocyte maturation. *Molecular Endocrinology*, 28(5), 706-721.
- Kearney, H. M., Thorland, E. C., Brown, K. K., Quintero-Rivera, F., & South, S. T. (2011). American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genetics in Medicine*, 13(7), 680-685.
- Kebapcilar, A. G., Kulaksizoglu, M., Kebapcilar, L., Gonen, M. S., Ünlü, A., Topcu, A., . . . Taner, C. E. (2013). Is there a link between premature ovarian failure and serum concentrations of vitamin D, zinc, and copper? *Menopause*, 20(1), 94-99.
- Kim, S., Pyun, J.-A., Cha, D. H., Ko, J.-J., & Kwack, K. (2011). Epistasis between FSHR and CYP19A1 polymorphisms is associated with premature ovarian failure. *Fertility and sterility*, 95(8), 2585-2588.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Kirchhoff, M., Gerdes, T., Maahr, J., Rose, H., Bentz, M., Döhner, H., & Lundsteen, C. (1999). Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes, chromosomes and cancer*, 25(4), 410-413.
- Kirchhoff, M., Rose, H., & Lundsteen, C. (2001). High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *Journal of medical genetics*, 38(11), 740-744.
- Kloc, M., Ghobrial, R. M., Borsuk, E., & Kubiak, J. Z. (2012). Polarity and asymmetry during mouse oogenesis and oocyte maturation *Mouse Development* (pp. 23-44): Springer.
- Knauff, A. (2009). Premature ovarian failure: from phenotype to genotype.
- Knauff, E. A., Blauw, H. M., Pearson, P. L., Kok, K., Wijmenga, C., Veldink, J. H., . . . Franke, L. (2011). Copy number variants on the X chromosome in women with primary ovarian insufficiency. *Fertility and sterility*, 95(5), 1584-1588. e1581.
- Knauff, E. A., Franke, L., Van Es, M. A., Van den Berg, L. H., Van der Schouw, Y. T., Laven, J. S., . . . Christin-Maitre, S. (2009). Genome-wide association study in premature ovarian failure patients suggests ADAMTS19 as a possible candidate gene. *Human reproduction*, 24(9), 2372-2378.
- Kodaman, P. (2010). *Early menopause: primary ovarian insufficiency and surgical menopause*. Paper presented at the Seminars in reproductive medicine,28(5), 360.
- Kokcu, A. (2010). Premature ovarian failure from current perspective. *Gynecological Endocrinology*, 26(8), 555-562.
- Kosaki, K., Sato, S., Hasegawa, T., Matsuo, N., Suzuki, T., & Ogata, T. (2004). Premature ovarian failure in a female with proximal symphalangism and Noggin mutation. *Fertility and sterility*, 81(4), 1137-1139.
- Krauss, C. M., Turksoy, R. N., Atkins, L., McLaughlin, C., Brown, L. G., & Page, D. C. (1987). Familial premature ovarian failure due to an interstitial deletion of the long arm of the X chromosome. *New England Journal of Medicine*, 317(3), 125-131.
- Le Fevre, A. K., Taylor, S., Malek, N. H., Horn, D., Carr, C. W., Abdul-Rahman, O. A., . . . Gecez, J. (2013). FOXP1 Mutations Cause Intellectual Disability and a Recognizable Phenotype y. *American journal of medical genetics*, 3166-3173.
- Ledig, S., Röpke, A., & Wieacker, P. (2010). Copy number variants in premature ovarian failure and ovarian dysgenesis. *Sexual Development*, 4(4-5), 225-232.
- Lee, C., & Scherer, S. W. (2010). The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert reviews in molecular medicine*, 12, 8.
- Li, X., Lv, L., Zheng, J., Zhou, J., Liu, B., Chen, H., . . . Li, X. (2014). The significance of LRPPRC overexpression in gastric cancer. *Medical Oncology*, 31(2), 1-8.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Liu, L., Tan, R., Cui, Y., Liu, J., & Wu, J. (2013). Estrogen receptor α gene (ESR1) polymorphisms associated with idiopathic premature ovarian failure in Chinese women. *Gynecological Endocrinology*, 29(2), 182-185.
- Loutradis, D., Patsoula, E., Stefanidis, K., Drakakis, P., Antonakis, G., Bletsas, R., . . . Michalakis, S. (2006). Follicle-stimulating hormone receptor gene mutations are not evident in Greek women with premature ovarian failure and poor responders. *Gynecological and obstetric investigation*, 61(1), 56-60.
- Lu, X., Shaw, C. A., Patel, A., Li, J., Cooper, M. L., Wells, W. R., . . . Bacino, C. A. (2007). Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PloS one*, 2(3), 327.
- Luoma, P., Melberg, A., Rinne, J. O., Kaukonen, J. A., Nupponen, N. N., Chalmers, R. M., . . . Majamaa, K. (2004). Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase γ mutations: clinical and molecular genetic study. *The Lancet*, 364(9437), 875-882.
- Maclaran, K., Horner, E., & Panay, N. (2010). Premature ovarian failure: long-term sequelae. *Menopause International*, 16(1), 38-41.
- MANDL, A. M., & Zuckerman, S. (1951). The relation of age to numbers of oocytes. *Journal of Endocrinology*, 7(2), 190-193.
- Mandon-Pépin, B., Touraine, P., Kuttann, F., Derbois, C., Rouxel, A., Matsuda, F., . . . Fellous, M. (2008). Genetic investigation of four meiotic genes in women with premature ovarian failure. *European Journal of Endocrinology*, 158(1), 107-115.
- Marozzi, A., Vegetti, W., Manfredini, E., Tibiletti, M. G., Testa, G., Crosignani, P. G., . . . Dalprà, L. (2000). Association between idiopathic premature ovarian failure and fragile X premutation. *Human reproduction*, 15(1), 197-202.
- McGuire, M. M., Bowden, W., Engel, N. J., Ahn, H. W., Kovanci, E., & Rajkovic, A. (2011). Genomic analysis using high-resolution single-nucleotide polymorphism arrays reveals novel microdeletions associated with premature ovarian failure. *Fertility and sterility*, 95(5), 1595-1600.
- ME, E. E. v., & Derneği, A. (2014). Adrenal ve Gonadal Hastalıklar Kılavuzu. 120-122.
- Mendelsohn, B. A., Mehta, N., Hameed, B., Pekmezci, M., Packman, S., & Ralph, J. (2013). Adult-Onset Fatal Neurohepatopathy in a Woman Caused by MPV17 Mutation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 13, 37-41.
- Monniaux, D., Clément, F., Dalbiès-Tran, R., Estienne, A., Fabre, S., Mansanet, C., & Monget, P. (2014). The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles: What Is the Link? *Biology of reproduction*, 90(4), 85.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Mujoomdar, M. L., Hogan, L. M., Parlow, A. F., & Nachtigal, M. W. (2011). Pcsk6 mutant mice exhibit progressive loss of ovarian function, altered gene expression, and formation of ovarian pathology. *Reproduction*, 141(3), 343-355.
- Murray, A., Webb, J., Dennis, N., Conway, G., & Morton, N. (1999). Microdeletions in FMR2 may be a significant cause of premature ovarian failure. *Journal of medical genetics*, 36(10), 767-770.
- Nayot, D., Chung, J. T., Son, W.-Y., Ao, A., Hughes, M., & Dahan, M. H. (2013). Live birth following serial vitrification of embryos and PGD for fragile X syndrome in a patient with the premutation and decreased ovarian reserve. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(11), 1439-1444.
- Nelson, L. M. (2009). Primary ovarian insufficiency. *New England Journal of Medicine*, 360(6), 606-614.
- Nelson, S. M., Messow, M. C., Wallace, A. M., Fleming, R., & McConnachie, A. (2011). Nomogram for the decline in serum antimüllerian hormone: a population study of 9,601 infertility patients. *Fertility and sterility*, 95(2), 736-741.
- Noma, N., Kawashima, I., Fan, H.-Y., Fujita, Y., Kawai, T., Tomoda, Y., . . . Shimada, M. (2011). LH-induced neuregulin 1 (NRG1) type III transcripts control granulosa cell differentiation and oocyte maturation. *Molecular Endocrinology*, 25(1), 104-116.
- Norling, A., Hirschberg, A., Rodriguez-Wallberg, K., Iwarsson, E., Wedell, A., & Barbaro, M. (2014). Identification of a duplication within the GDF9 gene and novel candidate genes for primary ovarian insufficiency (POI) by a customized high-resolution array comparative genomic hybridization platform. *Human reproduction*, 29(8), 1818-1827.
- O'Herlihy, C., Pepperell, R., & Evans, J. (1980). The significance of FSH elevation in young women with disorders of ovulation. *British medical journal*, 281(6253), 1447.
- Ogata, T., Matsuo, N., Fukushima, Y., Saito, M., Nose, O., Mihar, N., . . . Ishizuka, B. (2001). FISH analysis for apparently simple terminal deletions of the X chromosome: identification of hidden structural abnormalities. *American journal of medical genetics*, 104(4), 307-311.
- Ohl, J., Partisani, M., Demangeat, C., Binder-Foucard, F., Nisand, I., & Lang, J. (2010). [Alterations of ovarian reserve tests in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected women]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité*, 38(5), 313-317.
- Ojeda, D., Lakhali, B., Fonseca, D. J., Braham, R., Landolsi, H., Mateus, H. E., . . . Laissue, P. (2011). Sequence analysis of the *CDKN1B* gene in patients with premature ovarian failure reveals a novel mutation potentially related to the phenotype. *Fertility and sterility*, 95(8), 2658-2660.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Oktaý, K., Karlikaya, G., Akman, O., Ojakian, G. K., & Oktaý, M. (2000). Interaction of extracellular matrix and activin-A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. *Biology of reproduction*, 63(2), 457-461.
- Oldenburg, R., Van Dooren, M., De Graaf, B., Simons, E., Govaerts, L., Swagemakers, S., . . . Bertoli-Avella, A. (2008). A genome-wide linkage scan in a Dutch family identifies a premature ovarian failure susceptibility locus. *Human reproduction*, 23(12), 2835-2841.
- Pariani, M. J., Spencer, A., Graham Jr, J. M., & Rimoin, D. L. (2009). A 785kb deletion of 3p14. 1p13, including the *FOXP1* gene, associated with speech delay, contractures, hypertonia and blepharophimosis. *European journal of medical genetics*, 52(2), 123-127.
- Pellicer, A., Miro, F., Sampaio, M., Gomez, E., & Bonilla-Musoles, F. (1991). In vitro fertilization as a diagnostic and therapeutic tool in a patient with partial 17, 20-desmolase deficiency. *Fertility and sterility*, 55(5), 970-975.
- Persani, L., Rossetti, R., & Cacciatore, C. (2010). Genes involved in human premature ovarian failure. *Journal of molecular endocrinology*, 45(5), 257-279.
- Pfender, S., Kuznetsov, V., Pleiser, S., Kerkhoff, E., & Schuh, M. (2011). Spire-type actin nucleators cooperate with Formin-2 to drive asymmetric oocyte division. *Current Biology*, 21(11), 955-960.
- Piette, C., De Mouzon, J., Bachelot, A., & Spira, A. (1990). In-vitro fertilization: influence of women's age on pregnancy rates. *Human reproduction*, 5(1), 56-59.
- Platteau, P., Sermon, K., Seneca, S., Van Steirteghem, A., Devroey, P., & Liebaers, I. (2002). Preimplantation genetic diagnosis for fragile Xa syndrome: difficult but not impossible. *Human reproduction*, 17(11), 2807-2812.
- Pyun, J.-A., Kim, S., Cha, D. H., & Kwack, K. (2013). Epistasis between polymorphisms in TSHB and ADAMTS16 is associated with premature ovarian failure. *Menopause (New York, NY)*.
- Pyun, J.-A., Kim, S., Cha, D. H., & Kwack, K. (2014). Polymorphisms within the FANCA gene associate with premature ovarian failure in Korean women. *Menopause*, 21(5), 530-533.
- Pyun, J.-A., Kim, S., & Kwack, K. (2015). Epistasis between polymorphisms in ACVR2B and ADAMTS19 is associated with premature ovarian failure. *Menopause*, 22(2).
- Qin, Y., Choi, Y., Zhao, H., Simpson, J. L., Chen, Z.-J., & Rajkovic, A. (2007). NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3), 576-581.

- Qin, Y., Vujovic, S., Li, G., Li, J., Dalgleish, R., Simpson, J. L., . . . Al-Azzawi, F. (2014). Ethnic specificity of variants of the ESR1, HK3, BRSK1 genes and the 8q22. 3 locus: No association with premature ovarian failure (POF) in Serbian women. *Maturitas*, 77(1), 64-67.
- Quilter, C., Karcianas, A., Bagga, M., Duncan, S., Murray, A., Conway, G., . . . Affara, N. (2010). Analysis of X chromosome genomic DNA sequence copy number variation associated with premature ovarian failure (POF). *Human reproduction*, 25(8), 2139-2150.
- Rah, H., Jeon, Y. J., Lee, B. E., Kim, J. O., Shim, S. H., Lee, W. S., . . . Kim, N. K. (2013). Association of polymorphisms in microRNA machinery genes (DROSHA, DICER1, RAN, and XPO5) with risk of idiopathic primary ovarian insufficiency in Korean women. *Menopause*, 20(10), 1067-1073.
- Rebar, R. W., & Connolly, H. V. (1990). Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 45(11), 763-764.
- Rizzolio, F., Bione, S., Sala, C., Goegan, M., Gentile, M., Gregato, G., . . . Toniolo, D. (2006). Chromosomal rearrangements in Xq and premature ovarian failure: mapping of 25 new cases and review of the literature. *Human reproduction*, 21(6), 1477-1483.
- Rizzolio, F., Pramparo, T., Sala, C., Zuffardi, O., De Santis, L., Rabbellotti, E., . . . Toniolo, D. (2009). Epigenetic analysis of the critical region I for premature ovarian failure: demonstration of a highly heterochromatic domain on the long arm of the mammalian X chromosome. *Journal of medical genetics*, 46(9), 585-592.
- Rodriguez, C. I., & Stewart, C. L. (2007). Disruption of the ubiquitin ligase *HERC4* causes defects in spermatozoon maturation and impaired fertility. *Developmental biology*, 312(2), 501-508.
- Roth, L., & Alvero, R. (2014). Pregnancy in a woman with premature ovarian insufficiency associated with blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome type I. A case report. *The Journal of reproductive medicine*, 59(1-2), 87.
- Santoro, N. (2003). *Mechanisms of premature ovarian failure*. Paper presented at the Annales d'endocrinologie, 64(2), 87-92.
- Schmidt, P. J., Cardoso, G. M., Ross, J. L., Haq, N., Rubinow, D. R., & Bondy, C. A. (2006). Shyness, social anxiety, and impaired self-esteem in Turner syndrome and premature ovarian failure. *Jama*, 295(12), 1373-1378.
- Sermondade, N., Hafhouf, E., Dupont, C., Bechoua, S., Palacios, C., Eustache, F., . . . Sifer, C. (2011). Successful childbirth after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection without assisted oocyte activation in a patient with globozoospermia. *Human reproduction*, der258.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Shaikh, T. H. (2007). Oligonucleotide arrays for high-resolution analysis of copy number alteration in mental retardation/multiple congenital anomalies. *Genetics in Medicine*, 9(9), 617-625.
- Shelling, A. N. (2000). X chromosome defects and premature ovarian failure. *Australian and New Zealand journal of medicine*, 30(1), 5-7.
- Shelling, A. N., & Ferguson, L. R. (2007). Genetic variation in human disease and a new role for copy number variants. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 622(1), 33-41.
- Sherman, S. L. (2000). Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *American journal of medical genetics*, 97(3), 189-194.
- Shimizu, Y., Kimura, F., Takebayashi, K., Fujiwara, M., Takakura, K., & Takahashi, K. (2009). Mutational analysis of the PTEN gene in women with premature ovarian failure. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, 88(7), 824-825.
- Shinawi, M., & Cheung, S. W. (2008). The array CGH and its clinical applications. *Drug discovery today*, 13(17), 760-770.
- Simon, A. M., Goodenough, D. A., Li, E., & Paul, D. L. (1997). Female infertility in mice lacking connexin 37.
- Simpson, J. L. (2008). Genetic and Phenotypic Heterogeneity in Ovarian Failure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135(1), 146-154.
- Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Döhner, H., . . . Lichter, P. (1997). Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes, chromosomes and cancer*, 20(4), 399-407.
- Stigliani, S., Anserini, P., Nicoletti, A. J., Di Luca, M., & Sozzi, F. (2013). Insight into the Genomics of Premature Ovarian Failure. *J Mol Genet Med*, 7(78), 1747-0862.1000078.
- Tachdjian, G., Aboura, A., Portnoi, M.-F., Pasquier, M., Bourcigaux, N., Simon, T., . . . Christin-Maitre, S. (2008). Cryptic Xp duplication including the SHOX gene in a woman with 46, X, del (X)(q21. 31) and premature ovarian failure. *Human reproduction*, 23(1), 222-226.
- Tassone, F., Hagerman, R. J., Taylor, A. K., Gane, L. W., Godfrey, T. E., & Hagerman, P. J. (2000). Elevated Levels of FMR1 mRNA in Carrier Males: A New Mechanism of Involvement in the Fragile-X Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 66(1), 6-15.
- Tesfaye, D., Regassa, A., Rings, F., Ghanem, N., Phatsara, C., Tholen, E., . . . Hoelker, M. (2010). Suppression of the transcription factor MSX1 gene delays bovine preimplantation embryo development in vitro. *Reproduction*, 139(5), 857-870.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Tilly, J. L., & Sinclair, D. A. (2013). Germline energetics, aging, and female infertility. *Cell metabolism*, 17(6), 838-850.
- Tosh, D., Rani, H. S., Murty, U. S., Deenadayal, A., & Grover, P. (2015). Mutational analysis of the FIGLA gene in women with idiopathic premature ovarian failure. *Menopause (New York, NY)*, 22(5), 520-526.
- Tural, S., Tekcan, A., Kara, N., Elbistan, M., Güven, D., & Ali Tasdemir, H. (2014). FMR1 gene mutation screening by TP-PCR in patients with premature ovarian failure and fragile-X. *Gynecological Endocrinology*(0), 1-5.
- Vegetti, W., Marozzi, A., Manfredini, E., Testa, G., Alagna, F., Nicolosi, A., . . . Dalprà, L. (2000). Premature ovarian failure. *Molecular and cellular endocrinology*, 161(1), 53-57.
- Veltman, J. A., & de Vries, B. B. (2006). Diagnostic genome profiling: unbiased whole genome or targeted analysis? *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 8(5), 534.
- Vichinsartvichai, P., Manolertthewan, C., & Promrungrueng, P. (2014). Premature ovarian failure associated with reciprocal translocation of chromosomes 1 and 4: a case report and literature review. *Climacteric*(0), 1-8.
- Voorhuis, M., Onland-Moret, N., Fauser, B., Ploos, v. A. H., van der Schouw, Y., & Broekmans, F. (2013). The association of CGG repeats in the FMR1 gene and timing of natural menopause. *Human reproduction (Oxford, England)*, 28(2), 496-501.
- Wang, H.-X., Tekpetey, F. R., & Kidder, G. M. (2009). Identification of Wnt/ β -catenin signaling pathway components in human cumulus cells. *Molecular human reproduction*, 15(1), 11-17.
- Wang, J.-L., Li, S.-L., Qin, Y.-Y., & Chen, Z.-J. (2014). Analysis of progesterone receptor membrane component 1 mutation in Han Chinese women with premature ovarian failure. *Reproductive biomedicine online*, 29(5), 640-643.
- Wang, N., Luo, L.-L., Xu, J.-J., Xu, M.-Y., Zhang, X.-M., Zhou, X.-L., . . . Fu, Y.-C. (2014). Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. *Metabolism*, 63(1), 94-103.
- Watkins, W. J., Umbers, A. J., Woad, K. J., Harris, S. E., Winship, I. M., Gersak, K., & Shelling, A. N. (2006). Mutational screening of FOXO3A and FOXO1A in women with premature ovarian failure. *Fertility and sterility*, 86(5), 1518-1521.
- Weischenfeldt, J., Symmons, O., Spitz, F., & Korbel, J. O. (2013). Phenotypic impact of genomic structural variation: insights from and for human disease. *Nature Reviews Genetics*, 14(2), 125-138.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Weisman-Shomer, P., Cohen, E., & Fry, M. (2000). Interruption of the fragile X syndrome expanded sequence d (CGG) n by interspersed d (AGG) trinucleotides diminishes the formation and stability of d (CGG) n tetrahelical structures. *Nucleic acids research*, 28(7), 1535-1541.
- Welt, C. K. (2008). Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 68(4), 499-509.
- Wheeler, A. C., Bailey Jr, D. B., Berry-Kravis, E., Greenberg, J., Losh, M., Mailick, M., . . . Sherman, S. (2014). Associated features in females with an FMR1 premutation. *J. Neurodev. Disord*, 6, 30.
- Wilkins-Haug, L. (2014). Prenatal screening and diagnosis for fragile X syndrome. *Prenatal Diagnosis*, 34(2), 145-152.
- Wu, Y., Ghosh, S., Nishi, Y., Yanase, T., Nawata, H., & Hu, Y. (2005). The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFI-B modulate aromatase gene expression in ovarian granulosa cells: a possible mechanism for repression of aromatase expression upon luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 146(1), 237-246.
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., . . . Dube, J. L. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*, 15(6), 854-866.
- Yang, X., Zhou, Y., Peng, S., Wu, L., Lin, H.-Y., Wang, S., & Wang, H. (2012). Differentially expressed plasma microRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of mir-23a in granulosa cell apoptosis. *Reproduction*, 144(2), 235-244.
- Zhao, F., Zhao, W., Ren, S., Fu, Y., Fang, X., Wang, X., & Li, B. (2014). Roles of SIRT1 in granulosa cell apoptosis during the process of follicular atresia in porcine ovary. *Animal reproduction science*, 151(1), 34-41.
- Zhao, H., Chen, Z.-J., Qin, Y., Shi, Y., Wang, S., Choi, Y., . . . Rajkovic, A. (2008). Transcription Factor< i> FIGLA</i> is Mutated in Patients with Premature Ovarian Failure. *The American Journal of Human Genetics*, 82(6), 1342-1348.
- Zinn, A. R., & Ross, J. L. (2001). *Molecular analysis of genes on Xp controlling Turner syndrome and premature ovarian failure (POF)*. Paper presented at the Seminars in reproductive medicine.
- Zuckerman, S., & Baker, T. (1977). The development of the ovary and the process of oogenesis. *The ovary*, 1, 41-67.

Ekler Dizini

EK – 1 POY OLGULARI KLİNİK - GENETİK ÇALIŞMA FORMU

Adı Soyadı: Dosya no: Tanı tarihi

Yaş: İlk Adet yaşı:

Kilo: Boy: VKİ:

Başvuru Şikayeti : Adet düzensizliği
 Adet görememe
 Çocuk istemi
 Diğer

Adet düzeni: Normal
 Oligoamenore
 Menometroraji
 Amenore
 Diğer

USG: Follikül yok
 Follikül var (.....)

Laboratuvar:

FSH: LH: E2: PRL: TSH:

st3: St4: DHEA: AMH: İnhibin:

ALT: AST: Ca: P: AKŞ:

Kortizol: Tiroid oto Ab:

ANA: Hb: Plt: Sedim:

T.Protein: Albumin:

DEXA:

HRT kullanımı: Var
 Yok

Özgeçmiş: Kronik hastalık (IDDM Hipotiroidi Diğer.....)
 Otoimmün (Addison Ooforit Diğer.....)
 Metabolik (Hemokromatozis Galaktozemi 17 Hidroksilaz Aromataz)
 İatrojenik (KT RT Cerrahi Diğer.....)
 Genetik
 İdyopatik

İnfertilite : Var
 Yok

İnfertilite Var: IUI var
 IVF var

IVF Var: Siklus iptali (.....)
 Siklus iptali yok

IVF Toplanan Follikül sayısı :

IVF Toplanan Follikül çapları:

IVF Tedavisi Total Gonadotropin dozu:

IVF Ted.Protokolü:

Genetik Tarama Sonucu:

Karyotip:

X kromozom anomalileri: Turner Sendromu

Frajil X premutasyonu

Trizomi veya polizomi

Xp, Xq makro ve mikro delesyonlar

Otozomal ya da X kromozomal translokasyonlar

Otozomal Bozukluklar: FSHR mutasyonları

İnhibin gen mutasyonu

Otoimmün poliendokrinopati candidiasis-ektodermal distrofi (APECED) (Addison Hastalığı-İDDM-Hipotiroidi)

Perrault's Sendromu

BPES

EK – 2 AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

“Premature Ovaryan Yetmezlik olgularında genetik markerlerin öneminin ortaya konması” amacıyla bilimsel bir araştırma yapmayı planlamaktayız. Yapılması planlanan araştırmanın ismi “Prematür Over Yetmezliği Olgularındaki Genomik Değişikliklerinin Array CGH Yöntemi ile Değerlendirilmesi” dir.

Prematür Over Yetmezliği tanısı konan ve bu nedenle klinik takibi yapılan hastalardan alınan periferik kan örneklerinden yapılacak bu çalışmaya, tıbbi durumunuz bu koşullara uyduğu için sizi de davet ediyoruz. Ancak hemen belirtilmelidir ki araştırmaya katılıp katılmamak gönüllülük esasına dayalıdır. Bu bilimsel çalışmaya katılma kararını tamamen hür iradeniz ile vermelisiniz. Bu kararı verirken hiç kimse tarafından size telkin ve baskıda bulunulamaz. Kararınızdan önce söz konusu bilimsel araştırma ve bu araştırmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda yapılacak işlemler hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra bu bilimsel araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bilimsel Çalışma Hakkında Bilgiler

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni, Prematür Over Yetmezliği tanısı konmuş bir birey olmanızdır. Bu araştırma Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda gerçekleştirilecektir. Bu araştırmada Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından klinik tanısı konulan olgularda Premature Over Yetmezliğinde rol oynadığı düşünülen genlerdeki artma-eksilmeler yüksek çözünürlüklü array yöntemi ile incelenecektir. Bu genlerde meydana gelen artma-eksilmeler, sizdeki hastalığın gelişmesinde ve/veya ilerlemesinde rol oynayıp oynamadığının belirlenmesi, rol oynuyor ise hangi artma-eksilmelerin daha sık gözlemlendiğinin saptanması, ilerleyen süreç içerisinde bu genlerin incelenerek erken tanı ve/veya hastalık tedavisine yönelik protokollerin geliştirilmesi için ipucu olacaktır.

Bugün için sizin gibi Prematur Over Yetmezliği bulgusu gösteren olguların tanılarının konulmasında olgunun 40 yaş altı olması, FSH değerlerinin 40 IU/L ve daha üzerinde olması, en az 4 ay adetsiz dönemin olması kriterleri kullanılmaktadır. Ancak hastalığın gidişatı ile ilgili bir bilginin tanı anında ve yakın dönem takiplerinde söylenmesi son derece güçtür. Genetik analizler ile sizleri bekleyen durumlar literatür bilgileri doğrultusunda belirlenebilecek, anomali saptanması durumunda size ve/veya ailenize genetik danışma verilebilecektir. Hastalığın gidişatı ve tedavinin içeriği ile ilgili düzenlemelere gidilmesini gerektirecek değişiklikler saptanabilecektir. Böylelikle Prematur Over Yetmezliği bulgusu gösteren sizlerin tedavileri ve takip süreçleri ile ilgili planlama ve düzenleme yapma imkanı sağlanabilecektir. Prematür Ovaryan Yetmezlik bulgusu gösteren sizlerin ve yakın akrabalarınızın erken dönemde tanınızın konulması, olası menopozun erken dönemde tespit edilmesine ve tedavi planlamasına önceden fırsat verip, erken dönemde çocuk sahibi olma gibi üreme ile ilgili seçeneklere olanak tanıyacaktır.

Eğer Araştırmaya Katılmayı Kabul Ederseniz

- Bu çalışmaya davet edilmenize neden olan tıbbi durumunuz nedeniyle sizden alınacak kan örneğinden sadece söz konusu analizler gerçekleştirilecektir.
- Sizden söz konusu çalışma için ilave doku alınmayacaktır.
- Elde edilen genetik materyalinizin bu çalışma dışında gelecekteki bilimsel çalışmalar için de kullanılabilmesi tamamen sizin vereceğiniz onaya bağlıdır.
- Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgileriniz çok büyük bir hassasiyetle korunacaktır. İsimleriniz ve genetik analiz sonuçlarınız gizli tutulacaktır.
- Sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir.
- Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme yapılmayacaktır.
- Hekim ile aranızda kalması gereken size ait bilgilerin gizliliğine büyük özen ve saygı gösterilecektir.
- Gönüllü olarak katıldığımız çalışmanın herhangi bir aşamasında araştırmadan ayrılabilirsiniz. Ancak ayrılmadan önce araştırmacılara bu durumu bildirmeniz önemlidir.
- Çalışmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda tedavinizde ve klinik izlemlerinizde değişiklik olmayacaktır.

Katılımcının (Gönüllü) / Hastanın Beyanı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ile Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı işbirliğiyle bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler tarafıma aktarılmıştır.

Eğer bu araştırmaya katılırsam, hekim ile aramda kalması gereken, bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı gösterileceği, araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı kesin ve net bir şekilde belirtilmiştir.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Benden herhangi bir ücret talep edilmeyeceği ve bana da herhangi bir ödeme yapılmayacağı net ve kesin bir şekilde ifade edilmiştir.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilme hakkına sahip olduğum bildirilmiştir. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını da bilincindeyim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı herhangi bir davranışla karşılaşmış değilim.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (gönüllü) olarak yer alma kararını tamamen hür iradem ile almış bulunuyorum. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllük içerisinde kabul ediyorum.

Katılımcı (Gönüllü):

Adı, Soyadı:

Adres :

Telefon :

İmza :

Katılımcı (Gönüllü) ile Görüşen

Araştırmacı

Adı, Soyadı, Ünvanı:

Adres :

Telefon :

İmza :

EK – 3 ETİK KURUL KARAR FORMU

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
KARAR FORMU

Karar Tarihi: 21 Ağustos 2013

Karar Sayısı: 16

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Prof.Dr.Sevilhan ARTAN (Tez Danışmanı) ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Biyolog Halime KÜÇÜK (Tez Sahibi) tarafından yürütülen “*Prematür over yetmezliği olgularındaki genomik değişikliklerin Array CGH yöntemi ile değerlendirilmesi*” başlıklı çalışmanın görüş ve öneriler doğrultusunda yapılmasının uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir. Çalışmanızda başarılar dileriz.

ASLI GİBİDİR
2013

Özgeçmiş

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Halime Küçük
Doğum tarihi ve yeri : 01.01.1979 / Çifteler
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Evli
İletişim adresleri : Büyükdere Mh. Millet Cd. No:4/15
Eskişehir

Eğitim Durumu

(Tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru ilköğretim, lise, üniversite, yabancı dil / diller) :

Yabancı dil: İngilizce -İyi

Öğrenim Durumu:

1997-2001: Lisans, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Ed. Fakültesi Biyoloji Bölümü.

2001-2003: Y. Lisans, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bil. Ens. / Biyoloji / Moleküler Biyoloji

Mesleki Deneyim :

1997-2003: Yoğun Bakım Hemşiresi, Eskişehir Osmangazi Tıp Fakültesi

2003-.....: Uzman Biyolog, Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Uzmanlık Alanları:

Sitogenetik

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

Tıbbi Genetik Derneği

Yayınlar :

(Makale, Sözlü Bildiri, Poster Bildiri, Kitap, Kitap Bölümü vd.)

Küçük, H., Aydın, Y., Erzurumluoğlu, E., Özdemir, M., Hassa, H., & Artan, S. (2015). The effects of a heterochromatin polymorphism in chromosome 6 on premature ovarian failure. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(1), 41-43.

Bilimsel Etkinlikler

Burslar :
Ödüller :
Projeler :
Sözlü Konferans veya Seminerler :
Kurslar ve Eğitim Programları :