T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

PREMENAPOZAL HİRSUT/HİPERANDROJENİZMLİ KADINLARDA CYP21A2, CYP11B1, HSD3β2 VE NR3C4 (AR) LOKUSLARINA AİT GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Seher POLAT

Danışman
Prof.Dr. Munis DÜNDAR

Doktora Tezi

Kasım 2015
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

PREMENAPOZAL HİRSUT/HİPERANDROJENİZMLİ KADINLARDA CYP21A2, CYP11B1, HSD3β2 VE NR3C4 (AR) LOKUSLARINA AİT GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Seher POLAT

Danışman
Prof.Dr. Munis DÜNDAR

Doktora Tezi

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Projeler Araştırma Birimi tarafından TDK-2014-5099 ve TCD-2014-5098 kodlu projeleri ile desteklenmiştir.

Kasım 2015
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Seher POLAT

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"Premenapozal Hirsut/Hiperandrojenizmli Kadınlarda CYP21A2, CYP11B1, HSD3β2 ve NR3C4 (AR) Lokuslarına Ait Genetik Değişikliklerin Araştırılması" adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Seher POLAT

Danışman
Prof.Dr. Munis DÜNDAR

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr. Munis DÜNDAR

Prof.Dr. Munis DÜNDAR danışmanlığında **Seher POLAT** tarafından hazırlanan "Premenapozal Hirsut/Hiperandrojenizmli Kadınlarda CYP21A2, CYP11B1, HSD3β2 ve NR3C4 (AR) Lokuslarına Ait Genetik Değişikliklerin Araştırılması" adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Ünivesitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak Kabul edilmiştir.

…../…../2015

JÜRİ:

Danışman: Prof.Dr. Munis DÜNDAR

Üye: Prof.Dr. Kürşad ÜNLÜHİZARCI

Üye: Prof.Dr. Selim KURTOĞLU

Üye: Prof. Dr. Ferda ÖZKINAY

Üye: Prof. Dr. Feride İffet ŞAHİN

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun……tarih ve ……sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim esnasında desteğini, tecrübe ve bilgisini esirgemeyen tez danışmanım Prof.Dr. Munis DÜNDAR'a, Tıbbi Genetik AD öğretim üyeleri Prof.Dr. Yusuf ÖZKUL ve Doç.Dr. Çetin SAATÇİ'ye, tez konumun belirlenmesinde ve yapımında manevi ve bilimsel desteğini esirgemeyen Prof.Dr.H. Fahrettin KELEŞTEMUR ve Prof.Dr. Kürşad ÜNLÜHIZARCI'ya, hastaların toplanması ve klinik verilerin temininde ki yardımlarından dolayı Uzm. Dr. Sülbiye KARABURGU'ya, hasta kanlarının alınmasındaki katkılarından dolayı Endokrin Servis Hemşiresi Nilgün YILDIRIM'a, Genetik analizlerinin yapılmasında yardımları esirgemeyen Biyolog Mustafa AKKUŞ'a ve bu stresli yolda bana arkadaşlık eden Biyolog Selma BABACAN ve Dr. Meltem CERRAH'a, hayatımın her aşamasında büyük fedakarlıklar, sevgi ve şefkat ile yanımda olan Anne ve Baba'ma, sabrından dolayı ayrıca ağabey'ime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI ii
ONAY iii
TEŞEKKÜR iiv
İÇİNDEKİLER v
KISA ÖZET x
ABSTRACT xii
KISALTMALAR xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ xxx
TABLOLAR LİSTESİ xxxiii
GRAFİKLER LİSTESİ xxxiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. İnsan Genom ve Organizasyonu 4
2.2. Genetik Değişim Nedir? 8
2.3. Genomik Yeniden Düzenlenme Mekanizmaları 10
2.3.1. Krozomom/Genlerin Uzamsal Düzenlenişleri 12
2.3.2. Hücresel Stres 12
2.3.2.1. Genotoksik Stres 12
2.3.3.2. Oksidatif Stres 12
2.3.4.3. Replikasyon Stresi 12
2.3.3. Transkripsiyon ve DNA Kırıkları 13
2.3.4. Hatalı DNA Tamiri ve Rekombinasyon 14
2.3.4.1. Allelik ve Allelik Olmayan Homolog Rekombinasyon 14
2.3.4.2. Antijen Reseptör Farklanmasında Yer Alan Enzimler 14
2.3.5. DNA Sekans ve Kromatin Özellikleri 16
2.3.5.1. B-DNA Olmayan Yapı 16
2.3.5.2. CpG Bölgeleri 16
2.3.5.3. Tekrarlayan Elementler 14
2.3.5.4. Kromatin Modifikasyonları 16

2.4. Genotip-Fenotip İlişkisini Etkileyen Faktörler 17
2.4.1. Penetransı Etkileyen Faktörler 18
2.4.1.1. Dominant ve Resesif Durumlarda İnkomplet Penetrans 18
2.4.1.2. Mutasyon Tipi ve Penetrans 19
2.4.1.3. Gen İfadesindeki Varyasyonlar ve Penetrans 19
2.4.1.4. Penetrans ve Cinsiyet 20
2.4.1.5. Epigenetik Değişimler ve Penetrans 20
2.4.1.6. Gen-Çevre Arasındaki Etkileşim ve Penetrans 21
2.4.1.7. İlerleyen Yaş ve Penetrans 21
2.4.1.8. Oligogenik Kalıtım ve Penetrans 21
2.4.1.9. Digenik Kalıtım ve Penetrans 22
2.4.1.10. Modifiye Eden Genler ve Penetrans 22
2.4.1.11. Koruyucu Alleller ve Penetrans 23
2.5. Kolestrol Alımı, Depolanması ve Hücreler Arası Taşınım 24
2.5.1. Mitokondriye Kolesterol Taşınımı 25
2.5.2. Kolestrol Sentezi ve Taşınımı ile İlgili Hastalıklar 26
2.6. Doku Spesifik Steroid Sentez Yolakları 26
2.6.1. Adrenal Bez Steroid Hormon Sentezi 27
2.6.2. Gonadal Steroid Biyosentez Yolağı 30
2.6.3. Beyinde Steroid Biyosentezi (Nörosteroid) 32
2.6.4. Alternatif Yolaklar 35
2.7. Cinsiyet Hormonları 36
2.8. Steroid Biyosentez Enzimleri 38
2.8.1. Sitokrom P450 38
2.8.2. Hidroksisteroid Dehidrogenaz 40
2.9. CYP21A2 41
2.9.1. CYP21A2 Gen ve Özellikleri 41
2.9.2. CYP21A2 Eksikliği 44
2.9.3 Patofizyolojisi 44
2.9.4. Klinik Bulguları 45
2.10. CYP11B1 49
2.10.1. CYP11B1 Gen ve Özellikleri 49
2.10.2. CYP11B1 Eksikliği 50
2.10.3. Klinik Bulguları 50

2.10.4. Patofizyolojisi 51
2.11. HSD3β2 52
2.11.1. HSD3β2 Gen ve Özellikleri 52
2.11.2. HSD3β2 Eksikliği 52
2.11.3. Klinik Bulguları 53
2.12 AR (NR3C4) 53
2.12.1 AR Geni ve Özellikleri 53
3. GEREÇ VE YÖNTEM 55
3.1. Çalışma Grubu 55
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler 56
3.2.1. Cihaz-Alet Listesi ve Üretici Firmalar 56
3.2.2. Sarf Malzemele Listesi ve Üretici Firmalar 56
3.3. Hasta Veri ve Materyallerinin Toplanması 57
3.3.1. Klinik Tanı ve Kriterleri 57
3.3.2. DNA İzolasyonu ve Aday Genler 59
3.4. DNA Dizi Analizi 59
3.4.1. PCR ve PCR Ürünü Temizlenmesi 59
3.4.2. Sekans PCR ve PCR Ürünün Temizlenmesi 60
3.4.2.1. Sekans PCR 60
3.4.2.2. Sekans PZR Ürününün Temizlenmesi 62
3.4.2.3. Fragman Analizi 62
3.4.3. ABI3500 Genetik Analizatör Cihaz Ayarları ve Sonuçların Analizi 62
3.4.3.1. ABI3500 Genetik Analizatör Cihaz Ayarları 62
3.4.3.2. Sonuçların Analizi 62
3.5. İstatistiksel Analizler 63
4. BULGULAR 64
4.1. Hasta Tanıları 64
4.2. Kadın Gönüllülerde CYP11B1, CYP21A2, 3βHSD2 ve AR Genlerinde Belirlenen Değişimler ve Sıklığı 65
4.2.1. CYP21A2 Geninde Belirlenen Değişimler 65
4.2.2. CYP21A2 Promotör Bölgesi Değişimleri 68
4.2.3. CYP11B1 Geninde Belirlenen Değişimler 70
4.2.4. 3βHSD2 Geninde Belirlenen Değişimler 71
4.2.5. AR Geninde Belirlenen Değişimler 72
4.3. Kadın Gönüllülerde CYP11B1, CYP21A2 ve 3βHSD2 Gen Değişimleri ve Tanıları 75

4.3.1. CYP21A2 Gen Değişimleri ve Hasta Tanıları 75
4.3.1.1. Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup 75
4.3.1.2. Şikâyeti Olmayan Gönüllü Grubu 76
4.3.2. CYP21A2 Promotör Değişimleri ve Hasta Tanıları 78
4.3.2.1. Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup 78
4.3.2.2. Şikâyeti Olmayan Gönüllü Grubu 79
4.3.3. *CYP11B1* Gen Değişimleri ve Hasta Tanıları 81
4.3.3.1. Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup 81
4.3.3.2. Şikâyeti Olmayan Gönüllü Grubu 81
4.3.4. 3βHSD2 Gen Değişimleri ve Hasta Tanıları 83
4.3.4.1. Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup 83
4.3.4.2. Şikâyeti Olmayan Gönüllü Grubu 83
4.3.5. Belirlenen Kombine Değişimler ve Hasta Tanıları 83
4.3.5.1. Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup 84
4.3.5.2. Şikâyeti Olmayan Gönüllü Grubu 84
4.4. Çalışma Grubunda Belirlenen PoliQ Biallelik Değerleri ve Hasta Tanıları 86
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 87
5.1. Hasta Tanıları 87
5.1.1. Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup Tanıları 87
5.1.2. Şikâyeti Olmayan Gönüllü Grup Tanıları 89
5.2. Kadın Gönüllülerde *CYP11B1, CYP21A2* ve *3βHSD2* Genlerinde Belirlenen Değişimlerin Özellikleri ve Klinik Bulgular Üzerine Olan Etkileri 91
5.2.1 *CYP21A2* Geninde Belirlenen Değişimler 91
5.2.1.1. Yanlış Anlamlı Değişimler 93
5.2.1.2. Anlamsız Değişimler 98
5.2.1.3. Çerçeve Kayması Değişimleri 99
5.2.1.4. Alternatif Kesim Değişimleri 99
5.2.1.5. Gen Konversiyonu ve Gen Kaybı Değişimleri 99
5.2.1.6. Sessiz Değişimler 100
5.2.1.7. CYP21A2 Varyantları 101
5.2.1.8. CYP21A2 Promotör Değişimleri 102
5.2.2. *CYP11B1* Geninde Belirlenen Değişimler 109
5.2.2.1. Yanlış Anlamlı Değişimler 110
5.2.2.2 Kombine Değişimler 116
5.2.2.3. Sessiz Değişimler 116

5.2.3. 3βHSD2 Geninde Belirlenen Değişimler 119
5.2.3.1 Yanlış Anlamlı Değişimler 120
5.2.3.2 Sessiz Değişimler 120
5.3. CYP21A2, CYP11B1, HSD3B2 Genlerinde Meydana Gelen Değişimler ve Hasta Tanılarının Karşılaştırılması/İstatistiki Verilen Değerlendirilmesi 121
5.3.1. Çalışma Grupları ve Hasta Tanılarına Göre *CYP21A2, CYP11B1* ve *3βHSD2* Genlerine Ait Patolojik Değişimlerin Taşıyıcılık Durumu 122
5.3.1.1. Gönüllü Grubu 121
5.3.1.2. Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup 123
5.3.2. Hasta Tanılarına Göre *CYP21A2, CYP11B1* ve *3βHSD2* Genlerine Ait Patolojik Değişimler 124
5.3.3. *AR* Gen Polimorfizmi ile Klinik Bulguların İstatistiki Olarak Değerlendirilmesi .. 125
KAYNAKLAR 129
EKLER……..
ÖZGEÇMİŞ……

PREMENAPOZAL HİRSUT/HİPERANDROJENİZMLİ KADINLARDA CYP21A2, CYP11B1, HSD3β2 VE NR3C4 (AR) LOKUSLARINA AİT GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI

KISA ÖZET

Seher POLAT
Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Kasım 2015
Danışman: Prof.Dr. Munis DÜNDAR

Şuana kadar edinilen bilgiler doğrultusunda böbrek üstü bezleri (adrenal), yumurtalık, testis, plasenta, beyin ve deride sentezlenen steroid hormonlar hayatın her döneminde gelişimsel ve fizyolojik birçok hayati fonksiyonları düzenlemektedir.

Bu çalışmada hiperandrojenemi/hiperandrojenizm ile steroid biyosentezi ve fonksiyonunda görev alan gen anomalileri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Dolayısı ile çalışmaya, hirsutizm şikâyeti ile gelen 122 kadın hastanın verdikleri farklı klinik ve hormonal bulgular doğrultusunda yapılan detaylı analizleri sonucu idiyopatik hirsutizm (IH), idiyopatik hiperandrojenemi (IHA), klasik olmayan konjenital adrenal hiperplazi (NKAH) ve polikistik over sendromu (PKOS) tanısı alan hastalara ilave olarak kontrol olarak alınan 270 kadın gönüllü grubu aynı şekilde detaylı analizleri sonucu IH, IHA, PKOS, NKAH ve izole androjen yüksekliği ve normal olarak tanı alan toplamda 392 yetişkin kadın birey dâhil edilmiştir. CYP21A2, CYP11B1, ve HSD3β2 genine ait değişimler dizi analizi, AR geninde poliQ polimorfizmi ise fragman analizi ile belirlenmiştir. Sonuçlar çalışma grupları ve çalışma alt gruplarının tamamı göz önüne alınarak mukayeseli olarak verilmiştir.

Sonuç olarak, CYP11B1 ve CYP21A2 patolojik allel taşıyıcılık sıklığı sırası ile CYP11B2 ve CYP21A1P genleri ile olan mikro/makro gen konversiyonu kaynaklı olarak yüksek sırası ile %15.3 ve %17.3 bulunmuştur. HSD3B2 geni sahip olduğu değişimlerin azlığı nedeni ile oldukça korunaklı bir gen olarak belirlenmiştir. AR geni, poliQ tekrarı farklı Avrupa toplumlarına kıyasen düşük bulunmuştur. CYP11B1 ve CYP21A2 genlerine ait 5 farklı yeni değişim homozigot ve heterozigot formda

belirlenmiştir. Yapılan istatistiki analizlerde aday genlerin tamamında taşıyıcılık sıklığı ile çalışma grupları, klinik tanıları ve klinik veriler arasında anlamlı bir fark belirlenmemiş olup, sadece p.V281L değişimi istatistiki olarak hirsutizm grubunda yüksek bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Hirsutizm; CYP11B1; CYP21A2; 3βHSD2; hiperandrojenemi; mutasyon taraması.

STUDY OF POLYMORPHISMS OF CYP11B1, CYP21A2, 3βHSD2 AND NR3C4 (AR) GENES IN HIRSUTE/HYPERANDROGENEMIA WOMEN

ABSTRACT

Seher POLAT
Erciyes University
Graduate School of Health Sciences
Medical Genetics Department
PhD Thesis, November 2015
Supervisor: Prof.Dr. Munis DÜNDAR

According to knowledge obtained until now, steroid hormones synthesized by adrenal glands, ovary, testis, placenta, brain and skin organizes many developmental and physiological vital functions in all stages of life.

This study aimed to investigate the relationship between the genes defects in steroid biosynthesis/function and hyperandrogenism/hyperandrogenemia symptoms. Therefore, 122 the adult women who came to Endocrinology Department with complained of hirsutism and 270 adult volunteer women who have no health problems woman included. When detailed analysis performed in total 392 women in accordance with various clinical and hormonal findings, they were diagnosed as idiopathic hirsutism (IH), idiopathic hyperandrogenism (IHA), non- classic congenital adrenal hyperplasia (NKAH) and polycystic ovary syndrome (PCOS), isolated androgen excess and normal. CYP21A2, CYP11B1, and HSD3B2 changes determined by gene sequencing, polyQ polymorphism of AR gene was determined by fragment analysis. The results are given in comparison by considering all of the working groups (hirsute and volunteer) and subgroups (PKOS, IH etc.).

In conclusion, carrier frequency of CYP11B1 and CYP21A2 genes were found higher because of micro/ macro gene conversion respectively with CYP11B2 and CYP21A1P genes as %15.3 and 17.3% . HSD3β2 have been identified as a fairly sheltered because minority of determined changes. PolyQ repeat polymorphism of AR gene was found lower compare to different European countries. Five different novel changes have been identified in homozygote and heterozygote form on CYP11B1 and CYP21A2 genes. Statistical analysis performed between carrier frequency of all of candidate genes,

working groups, clinical diagnoses and clinical data showed no significant differences. Only, p.V281L changes showed statistically higher incidence in hirsutism group compare to volunteer women.

Keywords: Hirsutism; CYP11B1; CYP21A2; 3βHSD2; hyperandrogenemia; mutation screening.

KISALTMALAR

µl	: Mikro Litre
17βHSD1	: 3-Beta Hidroksi Steroid Dehidrogenaz Tip 1
17βHSD3	: 3-Beta Hidroksi Steroid Dehidrogenaz Tip 3
3βHSD2	: 3-Beta Hidroksi Steroid Dehidrogenaz Tip 2
5α-DHP	: 5α-Dihidoprogesteron
A	: Alanin
AA	: Amino asit
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ABI	: Applied Biosystem
ACAT	: Kolestrol Acil-Koenzim A (Coa):Açiltransferaz
ACTH	: Adronokotrikoit Hormone
ADRB2	: Beta-2 Adrenergik Reseptör
AID	: Aktivasyon İndüklenen Sitidin Deaminaz
AKR	: Aldo-Keto Redüktaz
AKR	: Aldo-Keto Redüktaz
ALD	: Aderolökodistrofi
AMPA	: α-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İsoksazolepropionik Asit
ANG	: Aangiogenin Precursor
a-NHEJ	: Alternatif Homolog Olmayan Rekombinasyon
AR	: Androjen Reseptörü
ARE	: Androjen Respons Elementler
ARMS2	: Yaş İlişkili Makülopati Duyarlılık Protein 2
B-DNA	: Sağ el heliks
BMPR2	: Kemik Morfogenetik Protein Reseptör Tip II
BRCA1	: Meme Kanseri 1
C	: Sitozin
C4A	: Komplement Komponent C4A/B Geni
C9orf72	: Chromosome 9 Open Reading Frame

cAMP : Siklik Adenozin Monofosfat
CFB : Komplement Sistem Protein Faktör B
CFH : Komplement Sistem Protein Faktör H
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CLCN1 : Klorid Kanalı Protein1(Chloride Channel Protein 1)
CMO II : Kortikosteron Metiloksidaz Tip II Eksikliği
c-NHEJ : Klasik Homolog Olmayan Rekombinasyon
CNS : Merkezi Sinir Sistemi
CSR : Sınıf Değişim Rekombinasyonları
CYP : Sitokrom
CYP11A : Kolestrol Yan Zincir Kesim Enzimi
CYP11B1 : Sitokrom 450, Familya 11, Altfamilya B, Polipeptit 1
CYP11B2 : Sitokrom 450, Familya 11, Altfamilya B, Polipeptit 2
CYP17A1 : Sitokrom 450, Familya 17, Altfamilya A, Aolipeptit 1
CYP19A : Sitokrom 450 aromataz
CYP21A1P : Sitokrom 450, Familya 21, Altfamilya A, Polipeptit 1, Yalancı Gen
CYP21A2 : Sitokrom 450, familya 21, Altfamilya A, Polipeptit 2
D : Aspartik Asit
DBD : DNA-Bağlama Domaini
DHEA : Dihidroepiandrosteron
DHEAS : Dihidroepiandrosteron Sülfat
DHT : Dihidro Testosteron
Dk : Dakika
DNA : Deoksi Riboz Nüklik Asit
dNTP : Nüklosit Trifosfat
DOC : 11-Deoksikortizol
DSBR : Çift Zincir Kırık Tamiri
E : Glutamik Asit
EBP : Emopamil Bağlanma Proteini
EDS : Ehlers–Danlos sendrom
EDTA : Etilen Deamin Tetra Asetik Asit
ER : Endoplazmik Retilum
ERG : Eritroblast Transformasyon- Spesifik (ETS) Ilişkili Gen

EtBr : Etidiyum Bromür
FdR : Ferrodoksin Redüktaz
Fdx : Ferrodoksin
FGS : Ferriman-Gallwey Skor
Fs : Çerçeve Kayması (frame-shift)
FSH : Follikül Uyarıcı Hormon
FUS : Fused in Sarcoma
G : Guanin
GABA : Gama Aminobütrik Asit
GCLC : Glutamatsistein Ligaz
GPCR : G proteine Bağlı (Coupled) Membran Reseptörünü
GSTM1 : Glutathione S-Transferaz 1
H- DNA : Tripleks DNA
H : Histidin
HFE : İnsan Hemokromatosis Proteini
HGM-CoA : 3-Hidroksi-3-Metilglutarik Koenzim A
HGMD : Human Genom Mutation Database
HLA : İnsan Lölosit Antijen
HR : Homolog Rekombinasyon
HSCR : Hirschsprung Hastalığı
HSL : Hormon-Sensetif Lipaz
HST : Hidroksisteroid Sülfataz
HTT : Hungtinton Hastalığı
I : İzolösin
IGF1 : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGF2 : İnsülin Benzeri büyüme faktörü 2
IH : İdiyopatik Hirsutizm
IHA : İdiyopatik Hiperandrojenemia
IMM : Mitokondrinin İç Zarına
IR : İnsülin Direnci
IVS : İntervenik Sekans (intron)
K : Lisin
KAH : Konjential Adrenal Hiperplazi

KAR : Kainat Reseptör
kVolts : Kilo Volt
L : Lösin
LBD : Ligand-Bağlama Domaini
LCGR : Luteinizing Hormon/Koriogonadotropin Reseptör
LCRs : Az Kopya Tekrarı (Low Copy Repeat)
LDL : Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LH : Lutenize Edici Hormonun
LINA : Uzun Serpiştirilmiş Nükleer Elemanları
SINE : Kısa Serpiştirilmiş Nükleer Element
LRRK2 : Leucine-Rich Repeat Kinase 2
LTR : Uzun Terminal Tekrar
M : Metiyonin
MBL2 : Mannoz Bağlanan Lektin 2
MC2R : Melanokortin Reseptör 2
MC4R : Melanokortin Reseptör 4
MGE : Mobil Genetik Elemenlar
MITE : Minyatür İnvert Tekrar Transpozon Elementleri
miRNA : Mikro RNA
MLN64 : Metastatik Lenf Nodu 64
mtDNA : Mitokontriyel DNA
MYBP3 : Miyozin Bağlanan Protein C Kardiyak
N : Asparajin
NADPH : Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NAHR : Allelik Olmayan Homolog Rekombinasyon
NCBI : National Center for Biotechnology Information
ncDNA : Protein Kodlamayan DNA
NHEJ : Homolog Olmayan Rekombinasyon
NIH : Ulusal Sağlık Enstitüsü
NKAH : Klasik Olmayan Konjenital Adrenal Hiperplazi
NMDA : N-Metil-D-Aspartat Reseptör
NR : Nükleer Reseptör
NURR1 : Nükleer Reseptör İlişkili-1 Protein

OD : Optik Densite
OKS : Oral Kontra Septif
OMM : Mitokondrinin Dış Zarı
P : Prolin
PKOS : Poliksitik Over Sendromu
POR : Peroksi Oksidoredüktaz
PP : Erken Puberte
PRDM9 : PR Domain Zink Finger Protein-9
pre-mRNA : Öncü mRNA
PROK2 : Prokinetisin 2
PROKR2 : Prokinetisin 2 reseptör
PRpH2 : Periferin 2
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Q : Glutamin
R : Arjinin
RAG : Rekombinasyon Aktive Eden Genler
RET : Ret Proto-onkogen
RNA : Ribonükleik Asit
ROM1 : Rod Outer Segment Membrane Protein-1
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
Rpm : Dakikadaki Devir (Revolutions Per Minute)
rRNA : Ribozomal RNA
S : Serin
SBMA : Spino Bulbar Kas Atrofi
SCN4A : Voltaj Bağımlı Sodyum Kanalı Tip IV Alfa
SDR : Kısa-Zincir Dehidrogenaz/Redüktaz
SDSA : Sentez Bağımlı İplik Bağlanması
SF1 : Steroidogenik Faktör-1
SHBG : Seks Hormonu Bağlayıcı Globin
SHM : Somatik Hipermutasyon
snRNA : Küçük Nükleolar RNA
SOD1 : Süperoksit Dismutaz
SREBP : Sterol Düzenleyici Eleman Bağlayıcı Proteinler

SSR : Basit Sekans Tekrarları
STAR : Steroidojenik Akut Düzenleyici Protein
START : StAR-İlişkili Lipid Transfer
SULT2A1 : Sülfotransferaz-2A
SUMAlasyon : Small-Ubiqutin Like Modifier, SUMOylation
SV : Basit Virilizan
SW : Tuz Kaybettiren
T : Timin
T : Treonin
TAD : Transaktivasyon Domaini
TARDB : Transaktif Respons DNA Bağlanma Proteini
TBE : Tris-Borat-EDTA
TE : Transpozon Element
TGF : Transforming Büyüme Faktörü
TGFB1 : Transforming Büyüme Faktörü Beta-1
TMPRSS2 : Transmembran Proteaz, Serine-2
TNF : Tumör Nekrosiz Faktör
TNXA : Tenaksin-A
TNXB : Tenaksin-B
ToP1 : DNA Topoizomeraz-1
ToP2B : DNA Topoizomeraz-2 Beta
TR : Tiroid Hormon Reseptörü
tRNA : Taşıyıcı RNA
U : Urasil
UTR : Transle Olmayan Bölge
UV : Ultra Viyole
V : Valin
VDJ : Somatik Rekombinasyon
VDR : Vitamin D3 Reseptör
W : Triptofan
Y : Tirosin
Z- DNA : Sol El Heliks

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. İnsan Genom ve Bileşenleri 7

Şekil 2.2. Üretilen Protein Grupları, Kodlayan Gen Sayıları ve Toplam Protein İçerisindeki Yüzdeleri 8

Şekil 2.3. Major Steroid Hormon Biyosentez Yolağı. 26

Şekil 2.4. Adrenal Kortekse Ait Katmanlar, Katmanlara Özgü Salınan Hormonlar ve Bu Hormonlar Üzerine Etki Eden Faktörler. 27

Şekil 2.5. Gonadal Steroid Biyosentez Yolağı. 31

Şekil 2.6. *CYP21A1P* Kaynaklı Patolojik Değişimler ve Lokalize Oldukları Ekzonlar. 42

Şekil 2.7. Kromozom 6q21 Bölgesinde Bulunan RCCX Modül ve Aynı Bölgede Görülen Kopya Sayısı Varyasyonları. 43

Şekil 4.1. Belirlenen Yeni p.A89V ve p.M187I Değişimlerine Ait Elektrogram Görüntüleri. 65

Şekil 4.2. Aynı Bireye Ait Allel Üzerinde Meydana Gelen Sırası İle p.P490P, p.G491S ve p.S493N Değişimlerinin Elektrogram Görüntüsü. 66

Şekil 4.3. Promotör Üzerinde Belirlenen Soldan Sağa Sırası İle -308 G>C Heterozigot, -296T>C, -295 A>C, -284 A>G, -282 T>G Homozigot Ve -210 T>C, -199 T>C, -196 T>C, -196inst Heterozigot Değişimler. 69

Şekil 4.4. *CYP11B1* Geni Üzerinde Belirlenen p.G87A (C.265 GGC>CGC) ve p.V188I (C.562 GTC>ATC) Değişimlerine Ait Elektrogram Görüntüsü. 70

Şekil 4.5 *3βHSD2* Genine Ait p. A167V (c.749 GCG>GTG) Değişiminin Elektrogram Görüntüsü. 72

Şekil 4.6. Heterozigot Olarak Belirlenen Allellerin Genemapper Programı İle Analiz Edildikten Sonraki Fragman Görüntüsü. 74

Şekil 4.7. Homozigot Olarak Belirlenen Allelin Genemapper Programı İle Analiz Edildikten Sonraki Fragman Görüntüsü. 74

Şekil 5.1. Bazı Türlerin *CYP21A2* Proteini Açısından Yakınlıklarını Göstermek Amacı ile Oluşturulan Filogenetik Ağaç. 93
Şekil 5.2. p.A89V Noktası İçin Farklı Türlerde *CYP21A2* Proteinine Ait Dizilerin Karşılaştırması. 94
Şeklil 5.3 p.M187I Noktası İçin Farklı Türlerde *CYP21A2* Proteinine Ait Dizilerin Karşılaştırması. 95
Şekil 5.4. p.G491S Noktası İçin Farklı Türlerde *CYP21A2* Proteinine Ait Dizilerin Karşılaştırması.. 98
Şekil 5.5. *CYP21A1P* ve *CYP21A2* Proksimal Promotörüne Ait DNA Dizisi Mukayesesi. 104
Şekil 5.6. p.D63H Noktası için Farklı Türlerde *CYP11B1* Proteinine Ait Dizilerin Karşılaştırması. 111
Şekil 5.7. *CYP11B1* ve *CYP11B2* Arasındaki Amino Asit Değişimlerinin Dağılımı. 111
Şekil 5.8. p.G87A Noktası için Farklı Türlerde *CYP11B1* Proteinine Ait Dizilerin Karşılaştırması. 112
Şekil 5.9. Bazı Türlerin *CYP11B1* Proteini Açısından Yakınlıklarını Göstermek Amacı ile Oluşturulan Filogenetik Ağaç. 112
Şekil 5.10. *CYP11B1* ve *CYP11B2* Proteinlerine Ait Homoloji Model Ribbon Yapısı. 113
Şekil 5.11. p.M188I Noktası için Farklı Türlerde *CYP11B1* Proteinine Ait Dizilerin Karşılaştırması. 114
Şekil 5.12. p.R246H Noktası için Farklı Türlerde *CYP11B1* Proteinine Ait Dizilerin Karşılaştırması. 114

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. İnsan Referans Geninin Gen Bileşenleri ve Fiziksel Organizasyonu.....5
Tablo 3.1. Kullanılan Cihaz İsimleri ve Üretici Firmalara Ait Bilgiler 56
Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemelerin Listesi ve Üretici Firmalar. 57
Tablo 3.3. PKOS Tanı Kriterleri. 58
Tablo 3.4. PZR Reaksiyonları İçin Kullanılan Primer Dizileri, Uzunluk ve Bağlanma Sıcaklıklarına Dair Bilgiler. 60
Tablo 3.5. Kullanılan Okuma Primer Dizileri. 61
Tablo 4.1. CYP21A2 Geninde Belirlenen Değişimler ve Sıklığı. 66
Tablo 4.2. Gen Konversiyonlarının Kapsadığı Ekzonlar ve Gen Konversiyonu Kaynaklı Meydana Gelen Değişimler. 67
Tablo 4.3. Belirlenen Proksimal Promotör Değişimleri, Klinik Etkisi ve Birey Sayıları. 68
Taplo 4.4. CYP11B1 Geninde Belirlenen Değişimler ve Sıklığı 70
Tablo 4.5. *3βHSD2* Geninde Belirlenen Değişimler ve Sıklığı 72
Tablo 4.6. Hirsutizm Şikâyeti İle Gelen Grupda Belirlenen *CYP21A2* Gen Değişimleri ve Klinik Tanıları 76
Tablo 4.7. Gönüllü Grubunda Belirlenen *CYP21A2* Gen Değişimleri ve Klinik Tanıları.....77
Tablo 4.8. Çalışma Grubunda Belirlenen *CYP21A2* Gen Değişimleri ve Klinik Tanıları.....77
Tablo 4.9. Hirsutizm Şikâyeti İle Gelen Grupda *CYP21A2* Genine Ait Proksimal Promotör Bölgesinde Belirlenen Değişimler.....78
Tablo 4.10. Gönüllü Grubunda *CYP21A2* Genine Ait Proksimal Promotör Bölgesinde Belirlenen Değişimler 79
Tablo 4.11. Çalışma Grubunda *CYP21A2* Genine Ait Proksimal Promotör Bölgesinde Belirlenen Değişimler 80
Tablo 4.12. Hirsutizm Şikâyeti İle Gelen Grupda Belirlenen *CYP11B1* Gen Değişimleri ve Klinik Tanıları. 81

Tablo 4.13. Gönüllü Grubunda Belirlenen *CYP11B1* Gen Değişimleri ve Klinik Tanıları.....82
Tablo 4.14. Çalışma Grubunda Belirlenen *CYP11B1* Gen Değişimleri ve Klinik Tanıları.....82
Tablo 4.15. Gönüllü Grubunda Belirlenen *3βHSD2* Gen Değişimleri ve Klinik Tanıları 83
Tablo 4.16. Hirsutizm Grubunda Belirlenen Kombine Değişimler ve Hasta Tanıları. 84
Tablo 4.17. Gönüllü Grubunda Belirlenen Kombine Değişimler ve Hasta Tanıları. 85
Tablo 5.1. Literatürde Belirlenen *CYP21A2* Genine Ait Değişimler ve Özellikleri.....105
Tablo 5.2. Literatürde Belirlenen *CYP11B1* Genine Ait Değişimler ve Özellikleri.....117
Tablo 5.3. Literatürde Belirlenen *3βHSD2* Genine Ait Değişimler ve Özellikleri.....120
Tablo 5.4. Gönüllü Grubunda Tanılara Göre Aday Genlerde Belirlenen Değişimlerin Dağılımı. 123
Tablo 5.5. Hirsutizm Grubunda Tanılara Göre Aday Genlerde Belirlenen Değişimlerin Dağılımı. 124
Tablo 5.6. Çalışma Gruplarından Bağımsız Olarak Hasta Tanıları ve Belirlenen Değişimlere Ait Değerlerin Karşılaştırması 125
Tablo 5.7. Gönüllü Grubunda Belirlenen Allellerine Ait CAG Tekrar Sayısı Ortalaması, Maksimum ve Minimum Tekrar Değerleri ve Biallelik Ortalamalarına Dair Veriler.....126
Tablo 5. 8. Hirsutizm Grubunda Belirlenen Allellerine Ait CAG Tekrar Sayısı Ortalaması, Maksimum ve Minimum Tekrar Değerleri ve Biallelik Ortalamalarına Dair Veriler. 126
Tablo 5. 9. Çalışma Grubuna Katılan Katılımcıların Allelerine Ait CAG Tekrar Sayısı Ortalaması, Maksimum ve Minimum Tekrar Değerleri ve Biallelik Ortalamalarına Dair Veriler.....126
Tablo 5.10. Farklı Popülasyonlarda Kontrol ve PKOS Grubunda Yapılan CAG Tekrar Polimorfizmi Çalışmaları 128

GRAFİKLER LİSTESİ

Sayfa No

Grafik 4.1. Heterozigot olarak belirlenen CAG tekrar ve birey sayıları. 73
Grafik 4.2. Homozigot Olarak Belirlenen CAG Tekrar ve Birey Sayıları. 73
Grafik 4.3. CAG Tekrar ve Allel Sayıları. 74
Grafik 4.4. Çalışma Gruplarına Ait PoliQ Biallelik Değerlerine Ait Veriler 86
Grafik 4.5. Çalışma Gruplarını Oluşturan Tanılara Ait PoliQ Biallelik Değerlerine Ait Veriler 86

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Şu ana kadar edinilen bilgiler doğrultusunda böbrek üstü bezleri (adrenal), yumurtalık, testis, plasenta ve beyinde sentezlenen steroid hormonlar hayatın her döneminde gelişimsel ve fizyolojik birçok hayati fonksiyonları düzenlemesine rağmen (1), dolaşımdaki miktarları, fonksiyonu bireylere ve yaş aralığına göre geniş varyasyon göstermektedir. Düzenlediği mekanizmaların genişliği düşünüldüğünde moleküler mekanizmaların kompleksliğine dair bir fikir oluşması kaçınılmazdır. Toplamda nüfusun kayda değer bir kısmını etkilemesine rağmen, primer ilgilenen araştırma gruplarının azlığından dolayı araştırılmayı bekleyen bir alan olarak bilim dünyasında kendisine geniş yer edinmiş ve neden olduğu hastalıkların çoğunluğu "yetim hastalıklar" içerisine dâhil edilmiştir (2-4).

Steroid hormonlar; mineralokortikoid (örn. aldosteron), glukokortikoid (örn. kortizol), cinsiyet hormonları (örn. testosteron, DHEA, androstenedion, 17b-estradiol) ve Vitamin D3 metabolitleridir. Kortizol ve aldosteron temel olarak böbrek üstü bezlerde, östrojen ve testosteron ise overler ve testiste üretilmesine rağmen, böbrek üstü bezlerinden salınan kortikoid ve cinsiyet hormonları embriyonik, sekonder cinsiyet karakterleri, immün ve sinir siteminin gelişimde önemli yere sahiptir (1). Dolayısı ile sentez yolağında meydana gelen bozukluk derecesine, bozukluğun kaynağına bağlı olarak geniş spektrumda klinik ve biyokimyasal bulgular vermektedir. Steroid sentez yolağı nisbeten az sayıda steroidojenik enzimleri ihiva etmesine rağmen, dokulara göre değişiklik gösteren ifadeleri, substrat ve kofaktörlerin ulaşılabilirliği steroidojenik

dokularda görülen geniş varyasyonlara ve dolayısı ile hastalığın ya da klinik bulguların etiyolojisinin anlaşılmasına karışıklık kazandırmaktadır (1).

Türk kadın popülasyonunda steroid biyosentez yolağında ve androgen mekanizmasında yer alan *CYP11B1, CYP21A2* ve *3βHSD2* genlerinin düzenleyici bölgesi (kor ve proksimal promoter, sadece *CYP21A2* genine uygulanmıştır), intron-ekzon bağlantı bölgeleri ve protein kodlayan bölgeleri dizi analizi, AR genine ait poliQ tekrarı ise fragman analizi ile analiz edilmesinin planlandığı bu çalışmada;1- Hiperandrojenemi/hiperandrojenizmin gen düzeyinde belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmalarda, gen üzerindeki belirli polimorfizim bölgeleri primer olarak ilgi alanını oluşturmuş olup, genin tamamında dizi analizi yapılmamıştır. Belirlenen aday genlerin (*CYP21A2, CYP11B1* ve *3βHSD2*) annote edilen düzenleyici (kor ve proksimal promotör, sadece *CYP21A2* geni için uygulanmıştır) ve protein kodlayan bölgelerinin tamamının dizi anlizinin yapılması, 2- Polikistik over sendromlu hastalarda yapılan çalışmalarda *CYP11B1* ve *3βHSD2* genlerine yönelik dizi analizi çalışması bulunmamakta olup, bu genlerde dizi analizinin yapılması, 3- Hirsutizm alanında yapılan çalışmaların çoğunluğu androjenlerin (primer olarak testosteronun) periferdeki metabolizması üzerine olup, böbrek üstü bezinde meydana gelebilecek hafif anomalilerin olasılığı ön plana çıkmamıştır. *CYP21A2, CYP11B1* ve *HSD3β2* gen mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan KAH (konjenital adrenal hiperplazi) her ne kadar otozomal resesif olarak kalıtılan genetik bir hastalık olsa da heterozigot bireylerde androjen fazlalığı nedeni olabileceği düşünülmektedir, dolayısı ile bu genlerdeki heterozigotluk durumunun hormon seviyeleri üzerine etkisi, 4- Yetişkin kadın bireylerde NKAH sıklığının belirlenmesi ve sahip oldukları mutasyonlar doğrultusunda bireylere genetik danışmanlığın verilmesi, 5- Türk kadın popülasyonuna özgü, aday genlerde meydana gelen polimorfizimler ve mutasyonlar belirlenerek mutasyon taşıyıcılığının (heterozigot) sıklığı adına temel oluşturacak bir çalışma olması, 6- Mevcut androjen miktarına bağlı olarak klinik bulguların değiştiği bilinen hirsutizm, idiyopatik hirsutizm, idiyopatik hiperandrojenism, polikistik over sendromu ya da konjenital adrenal hiperplazili kadın hasta grubunda, androjen reseptörünün birinci ekzonunda bulunan ve androjen reseptörü ifadesi ve parçalanma süresini etkilediği bilinen CAG tekrar polimorfizminin (5) Türk kadın popülasyonunda araştırılması, 7- Bu çalışma daha sonra yapılması planlanan, yolakta yer alan genlerin genetik düzenlenişinin anlaşılmasına yönelik *in vitro* çalışmalara katkı sağlaması ve öncü

olması, 8- Anlamlı polimorfizmin(lerin) belirlenmemesi durumunda, sonraki çalışmalar epigenetik faktörlerin (protein ve/veya protein kodlamayan RNA'ları sentezleyen genlerde mutasyon/polimorfizim gibi kalıcı değişiklik olmamasına rağmen gen ya da gen ürününün etkisini düzenleyen mekanizmalar) araştırılması doğrultusunda yönlendirilmesine öncü olması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsan Genom ve Organizasyonu

Birleşmiş Milletler Ekonomik ve Sosyal İlişikiler (United Nations Department of Economic and Social Affairs) Bölümü 2014 verilerine göre Dünya nüfusu 7 milyarın üzerindedir ve herbir birey bir hücre olan zigottan köken alıp yetişkin döneminde 100 trilyon hücrenin mükemmel bir düzen içinde işlemesi ile meydana gelmektedir. İnsan genomu insanın sahip olduğu genetik bilginin tamamını tarif eden terim olup, bu bilgi hücre çekirdeğinde yer alan 23 çift kromozom ve mitokondride yer alan mtDNA (mitokondriyel DNA) içerisinde saklanmakta ve herbir kromozom farklı fiziksel özellik ve DNA içeriği sergilemektedir (Tablo 2. 1). Her haploid hücre 3 milyar DNA baz çifti ihtiva etmektedir ve bireyler arasındaki benzerlik baz düzeyinde %99'dan daha fazla olup sahip olunan bu farklılık herbir bireyi nadir kılan etmenlerden bir tanesini oluşturmaktadır (6).

Tablo 2.1. *İnsan Referans Geninin Gen Bileşesenleri ve Fiziksel Organizasyonu.*

Krmzm	Uzunluk (mm)	Büyüklük (bp)	Varyasyon sayısı	Tanımlanan protein sayısı	Yalancı gen sayısı	miRNA sayısı	rRNA sayısı	snRNA sayısı	snoRNA sayısı	Sentromer pozisyonu (Mpb)
1	85	249.250.621	4.401.091	2.012	1130	134	66	221	145	125.0
2	83	243.199.373	4.607.702	1.203	948	115	40	161	117	93.3
3	67	198.022.430	3.894.345	1.040	719	99	29	138	87	91.0
4	65	191.154.276	3.673.892	718	698	92	24	120	56	50.4
5	62	180.915.260	3.436.667	849	676	83	25	106	61	48.4
6	58	171.115.067	3.360.890	1.002	731	81	26	111	73	61.0
7	54	159.138.663	3.045.992	866	803	90	24	90	76	59.9
8	50	146.364.022	2.890.692	659	568	80	28	86	52	45.6
9	48	141.213.431	2.581.827	785	714	69	19	66	51	49.0
10	46	135.534.747	2.609.802	745	500	64	32	87	56	40.2
11	46	135.006.516	2.607.254	1.258	775	63	24	74	76	53.7
12	45	133.851.895	2.482.194	1.003	582	72	27	106	62	35.8
13	39	115.169.878	1.814.242	318	323	42	16	45	34	17.9
14	36	107.349.540	1.712.799	601	472	92	10	65	97	17.6
15	35	102.531.392	1.577.346	562	473	78	13	63	136	19.0
16	31	90.354.753	1.747.136	805	429	52	32	53	58	36.6
17	28	81.195.210	1.491.841	1.158	300	61	15	80	71	24.0
18	27	78.077.248	1.448.602	268	59	32	13	51	36	17.2
19	20	59.128.983	1.171.356	1.399	181	110	13	29	31	26.5
20	21	63.025.520	1.206.753	533	213	57	15	46	37	27.5
21	16	48.129.895	787.784	225	150	16	5	21	19	13.2
22	17	51.304.566	745.778	431	308	31	5	23	23	14.7
X	53	155.270.560	2.174.952	815	780	128	22	85	64	60.6
Y	20	59.373.566	286.812	45	327	15	7	17	3	12.5
mtDNA	0.0054	16.569	929	13	0	0	2	0	0	-

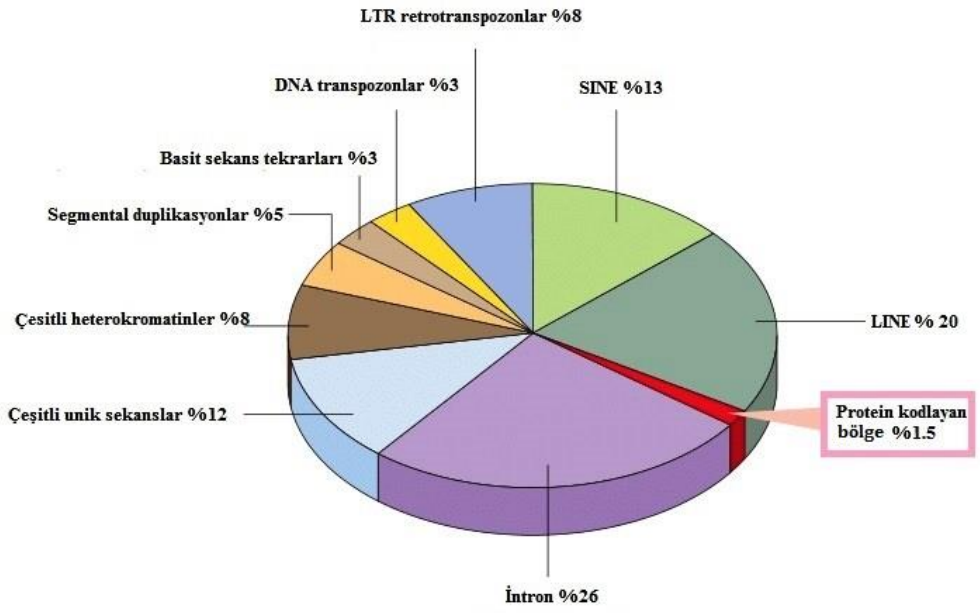
Tablo 2.1'de yer alan krozomom uznulukları herbir krozom üzerinde yer alan baz çiftinin DNA çift heliksde yer alan ve baz çifti arasındaki mesafe olan 0.34 nanometre ile çarpımı ile hesaplanmıştır. Verilen protein sayıları öncü mRNA (pre-mRNA) baz alınarak hesaplanmıştır. Alternatif kesim bölgeleri veya tranlasyonu takiben meydana gelen protein yapısındaki değişimler sonucu oluşan farklı proteinler dâhil edilmemiştir. Transkripsiyon sonrası meydana gelen düzenlemelerde görev alan micoRNA (miRNA), ribozom yapısında yer alan ribozomal RNA (rRNA), hücre çekirdeğinde yer alan ve

öncü mRNA'nın işlenmesinde ve transkripsiyonel faktörlerin düzenlenmesinde görev alan küçük nüklear RNA (snRNA)'lar yer almaktadır. Verilen varyasyonlar yapısal RNA ve protein kodlamayan genom birleşenleri Temmuz 2012'de tarihinde Ensembl tarafından yayınlanan veriler doğrultusunda hazırlanmıştır.

Prokaryot canlı kromozomlarının neredeyse tamamı protein kodlayan genlerden oluşmakla birlikte (7), ökaryotik canlılarda bu genler genomun küçük bir kısmını oluşturmaktadır (Şekil 2. 1). İnsan genomunu, 20.000-25.000 protein kodlayan gen ihtiva etmekte ve bu rakam toplam genomum %1.5'den daha az kısmını oluşturmaktadır (8-10) (Şekil 2.2). Protein kodlayan gen bölgeleri gen dizileri arasında yer alan ve genomun yaklaşık %26'sını oluşturan protein kodlamayan intron bölgeleri tarafından oluşmaktadır (10). Son zamanlarda öne sürülen diğer bir görüş hayvanlarda bulunan (bitki genomu hariç) ncDNA'nın büyük bir kısmı intronik ve dolayısı ile her ne kadar genom içerisinde protein kodlayan bölgeler az olsa da genomun büyük bir kısmının ifade (transkribe) olduğudur (11, 12). Taksonomik ölçüde genom büyüklüğü ile intron sayısı arasında pozitif bir ilişki belirlenmiştir (13). Yalancı Genler (pseudogenes), protein kodlayan genlerin fonksiyonel olmayan kopyaları olup, genom büyüklüğü arasındaki farklılığın açıklanmasında kullanılmasına ve çöp (junk) DNA olarak adlandırılmalarına rağmen şuan bu genlerin yaklaşık 19.000 tane olduğu ve genomun sadece küçük bir kısmını oluşturduğu bilinmektedir. Bu sayı, direkt DNA duplikasyonu, RNA'nın genoma tekrar entegre olması sonucu oluşan intron ihtiva etmeyen yalancı genler ve Numts olarak adlandırılan nükleer mitokontri orijinli yalancı genlerin toplamıdır (14).

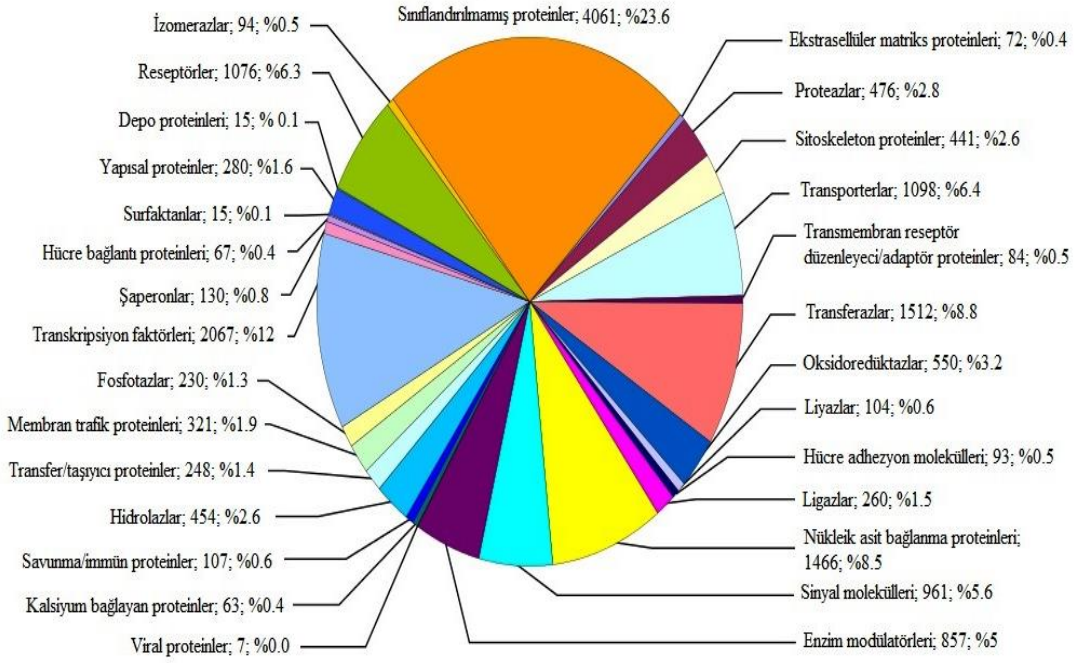
Ökaryotlarda, mobil genetik elemenlar (MGE)'dan biri olan transpozon elementler (TE) genom içerisindeki yer değiştirme özelliklerine bağlı olarak Grup 1 ve 2 olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Grup 1 transpozon elementler, RNA aracılığı ile yer değiştirme özelliği olan grup olmakla birlikte uzun serpiştirilmiş nükleer elemanları (long interspersed nuclear element; (LINA), kısa serpiştirilmiş nükleer elemanları (short interspersed nuclear element; SINE), endojen retrovirüsler ve uzun terminal tekrar (LTR) retrotranspozonları ihtiva eder. Grup 2 transpozon elementler direkt olarak DNA'dan köken alır ve RNA gibi aracı molekül olmadan DNA içerisine entegre olabilir. Bu grup DNA transpozonları ve minyatür invert tekrar transpozon elementleri (miniature inverted–repeat transposable elements, MITE) ihtiva eder. Transpozon

elementler genomun büyük bir kısmını oluşturmakla birlikte TE'lerin evrimsel oluşumu, parazitizm ve mutualizm gibi konakçı genom ve diğer subgenomik elementler arasındaki kompleks etkileşimleri kapsamaktadır. Aynı zamanda mikrosatellit olarak bilinen basit sekans tekrarları (SSR), segmental duplikasyonlar, çeşitli heterokromatin bölgeleri ve ünik DNA dizleri genomun diğer bileşenleridir (10, 15-18).



Şekil 2.1. *İnsan Genom ve Bileşenleri.*

Kaynak: Gregory, 2005:6'den modifiye edilmiştir (19).



Şekil 2.2. *Üretilen Protein Grupları, Kodlayan Gen Sayıları ve Toplam Protein İçerisindeki Yüzdeleri Verilmiştir.*

2.2. Genetik Değişim Nedir?

Mutasyon genetik materyal üzerinde (protein kodlayan ya da kodlamayan) meydana gelen kalıcı değişiklikler olup organizmalar arasında farklılıkların temel nedenini oluşturur. Gen üzerinde meydana gelen mutasyonun, hiç bir etkiye sahip olmayacağı gibi gen ürünü modifiye etme ya da normal fonskiyon göstermesini kısmen ya da tamamen engellemek gibi farklı etkilere de neden olabilir. Gen üzerinde meydana gelen değişiklikler farklı hücre ve farklı mekanizmalar sonucu meydana gelebilir ve etki itibari ile evrim ya da immün sistemin adaptasyonu gibi normal olayların yanısıra tek gen hastalıkları ya da kanser gibi multifaktöriyel hastalıklar gibi normal olmayan biyolojik olayların oluşumunu tetikler. Mutasyonun zararlı etkisini ve oluşumunu engellemek ya da meydana gelen bir mutasyonu tamir etmek için aynı zamanda farklı DNA tamir mekanizmalarına da sahiptir.

Mutasyonlar farklı şekillerde de meydana geldigi gibi mutasyonun nerede, hangi protein üzerinde, hangi seviyede etki yaptığı ve mutasyonun meydana geldiği organizmanın genetik ve çevresel etkileri ile birleşerek farklı neticelere neden olabilir.

Mutasyonlar genel olarak genom yapısına/organizasyonuna olan etkileri doğrultusunda gen seviyesinde ve kromozomal seviyede olmak üzere ikiye ayrılır. Kimyasallar veya DNA replikasyon hatası sonrası bir baz üzerinde meydana gelen **nokta mutasyonları (baz değişimleri)**, tekrar bölgelerinin replikasyonu esnasındaki hata veya transpozon elementlerin aktivitesi sonucu bir veya daha fazla nükleotidin DNA yapısına katılması ile oluşan **ilave (insersiyon)** mutasyonları ve benzer mekanizmalar ile baz kayıpları ile meydana gelen **delesyon (kayıp)** mutasyonları gen seviyesinde meydana gelen mutasyonları oluşturmaktadır. Meydana gelen baz kayıpları ve ilaveleri kodon kaybı veya ilavesi olmadığı sürece gen ürünü üzerinde kodon kaymasına (frameshift) dolayısı ile ürünün muhtevasının değişmesine neden olur. Nokta mutasyonları neden olduğu etkiye bağlı olarak protein kodlayan bölge üzerinde amino asit değişikliğine neden olmadığı durumlarda **sessiz (sinonim) mutasyonlar**, amino asit değişimine neden olduğu durumlarda **yanlış anlamlı (missense) mutasyonları** ve baz değişiminin protein üretiminin (translasyonu) zamanından önce durdurulmasına ile stop kodonu oluşumuna neden olması ise **anlamsız (nonsense) mutasyonlar** olarak adlandırılır. Kayıp mutasyonların birbirine çok yakın iki amino asit değişimine neden oluyor ise bu mutasyonlar **konservatif (nötr) mutasyon** olarak adlandırılır ve protein fonksiyonu üzerinde olumsuz bir etkisi yoktur. Aksi durumlarda meydana gelen amino asit değişimi protein fonksiyonunu olumsuz etkiler ve bu durum **konservatif olmayan mutasyon** olarak adlandırılır. Nokta mutasyonları **alternatif kesim bölgeleri** gibi düzenleyici gen bölgeleri üzerinde meydana gelerek protein yapısını tamamen etkileyebilir, dolayısı ile mutasyonun çeşidi kadar lokalizasyonu da önem taşımaktadır.

Gen dozajının artmasına, normal kromozom yapısının bozulması veya gen düzenlenişi değişikliklerine neden olan gen, kısmi veya tüm kromozomal **duplikasyonlar**, bir bütün kromozom ya da kromozom üzerinde belirli genlerin kaybına ve kromozom yapı ve gen düzenlenişi değişikliklerine neden olan **delesyonlar**, kromozom üzerindeki bölgelerin ters dönmesine neden olan **inversiyonlar** ve krozomlar arasındaki homolog olmayan parça değişimleri ile oluşan **kromozomal translokasyonlar** kromozomal anomaliler içerisine dâhil edilmektedir. Kromozom üzerinde meydana gelen kısmı DNA kayıp ve ilaveleri yeniden düzenlemeler ile birlikte farklı fonksiyon ve düzenlenmelere sahip **füzyon ya da hibrid genlerin** oluşmasına neden olabilir.

Mutasyonlar, yer aldıkları gen ürününde (enzim, protein vb) kısmi ya da tam **fonksiyon kayıplarına** neden olabileceği gibi, bu ürünlerin farklı ya da normal olmayan **fonksiyon kazanmasına** neden olabilir. Mutasyon kaynaklı değişen ürünün normal olan allele antagonist olarak etki etmesine **dominant negatif mutasyon** adı verilir. Bazı mutasyonlar var olduğu canlının ölümüne neden olur ve **lethal mutasyon** olarak adlandırılırken, bazı mutasyonlar var olan mutasyonların ortadan kalkmasına ve orijinal genotipine dönmesine neden olabilir, bu grup mutasyonlar **revers mutasyonlar** olarak adlandırılır.

Dolayısı ile genom içerisinde meydana gelen değişiklikler canlının yaşamına olumlu etki (avantaj) yapabileceği gibi olumsuz etkisi de (zararlı) söz konusu olabilir veya neden olduğu etki tamamen nötr veya hafif olumsuz etki (hafif nötr) olduğu için canlının yaşam veya çevreye olan uyumunu olumsuz olarak etkileyecek kadar güçlü olmaz.

Somatik mutasyon doku hücreleri içinde gerçekleşen bir mutasyon olup kalıtsal olamayacağı için kuşaktan kuşağa aktarılma kabiliyeti de yoktur. Eşey (üreme) hücresi mutasyonları, diğer ismiyle **germ hücre mutasyonları** ise kalıtsaldır ve bir sonraki nesillere aktarılır.

2.3. Genomik Yeniden Düzenlenme Mekanizmaları

Genomik yeniden düzenlemeler insan sağlık ve hastalıklarının ana taşlarındandır. Bunlar patojenler ile mücadelede antijen reseptörünün geniş varyasyonlarının oluşmasını düzenlerken aynı zamanda insanlarda kalıtımsal genetik hastalıklara neden olabileceği gibi yaşam sırasında meydana gelen değişimler (somatik mutasyonlar) kanser gibi hastalıklara da neden olabilir. Genomik yeniden düzenlenmeler genom içerisinde normalde yanyana olmaması gereken DNA dizilerin yanyana gelmesi ya da tam tersi gibi yapısal değişikliklere neden olmaktadır. Meydana gelen değişimin boyutu sadece bir baz çiftini, bir ekzonu kapsayacak olan bir kaç yüz baz çiftini ya da megabazları kaplayacak boyutlarda DNA kayıpları, ilaveleri, translokasyonları, inversiyon, duplikasyon ya da bunların kombinasyonları ile oluşan kompleks yeniden düzenlemeleri ihtiva edebilir. Genetik deşiğimlerin kapsamı kadar meydana geliş şekilleride farklılık gösterir. Tek gen nokta mutasyonları genellikle DNA replikasyon ve/veya tamiri hataları sonucu meydana gelirken (20, 21) daha büyük kapsamlı olanlar

genellikle genomun yapısı ile ilgili olarak aşağıda yer verilen farklı mekanizmalar sonucu meydana gelirler (20).

Genomik yeniden düzenlemelerin fonksiyonel sonuçları farklılık göstermekle birlikte (20) bunlar gen aktivasyonları, gen inaktivasyonları, novel (yeni) fonksiyon kazanımları ya da novel gen oluşumları ile birlikte gelen novel fonksiyon kazanımlarını ihtiva edebilir. Diğer taraftan genomik yeniden düzenlenmeler aynı zamanda normal proseslerin bir parçası olup buna en iyi örnek lenfositlerde meydana gelen ve antijen reseptör çeşitliliğine bağlı olarak farklı patojenlere karşı savunma imkanı sağlayan VDJ (somatik) rekombinasyon (22) ve sınıf değişim rekombinasyonları (CSR) (23) verilebilir. İmmunojik değişimlerin haricinde meydana gelen genomik yeniden düzenlemeler ilk olarak rastgele olaylar olarak düşünülmesine rağmen (24) kalıtılan değişimlerin ani ölümlere neden olmaması ve kanser gibi sonradan meydana gelen durumlarda ise hücreye özgü büyüme ve hayatta kalma imkânı sunması ile artık seçilen değişimler olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan hücre tipi, hücre basamağı (stage) ve gemomik içeriğinin çevresel ve hücresel etmenler tarafından tetiklenerek yeniden düzenlenmelere neden olabileceği ve bunun kanser nedeni olmak zorunda olmadığı açıklığa kavuşmuştur (25).

Yeniden düzenlenmelerin olması için bir seri olayların vuku bulması gerekmektedir. İlk olarak yeniden düzenlenecek olan DNA dizileri birbirlerine yakın mesafede olmalıdır ki bu mesafelerin hücre tipine bağlı olarak değiştiği veya belirli sinyal yolakları tarafından düzenlendiği bilinmektedir. İkinci olarak, DNA replikasyonu esnasında değişecek DNA parçaları için DNA kırıklarının oluşması gereklidir ki oluşacak olan yeni DNA farklı bölgelere ait parçaları ihtiva edebilsin. DNA kırıklarının oluşumu ve kalıp DNA (template) değişimi hücresel stres ya da DNA sekans içeriğine bağlı olarak değişiklik gösterebilir ve meydana gelebilir. Yeniden düzenlenmelerin meydana gelip gelmeyeceği DNA tamir veya rekombinasyon ve normal yolak üzerinde meydana gelen anomalilere bağlıdır. Son olarak, bazı DNA dizileri yapıları, ihtiva ettiği epigenetik modifikasyonları veya endonükleazlar ile olan ilişkileri itibari ile yeniden düzenlenmelere daha yatkındırlar (25).

Genel olarak yeniden düzenlemelere neden olan etmenleri krozomom/genlerin uzlamsal düzenlenişleri, hücresel stres, DNA tamir ve rekombinasyon hataları ve DNA sekans ve kromatin özellikleri olmak üzere dört katagoriye ayırabiliriz.

2.3.1. Krozomom/Genlerin Uzamsal Düzenlenişleri

Genomun çekirdek içerisindeki 3 boyutlu organizasyonu rastlantısal olmayan dinamik kromozomlar arasında ve aynı krozomom üzerindeki etkileşimlerini kapsamaktadır.

Görüntüleme ve sekans sistemlerinin gelişmesine paralel olarak yapılan çalışmalar (26-36) krozomların organizasyonun hücre farklılaşması, hücre sinyal yolağı ve transkripsiyon mekanizmalarına bağlı olarak nasıl değiştiği konusunda verilerin kazanımına imkân sağlamıştır. Bu çalışmalar ışığı altında kromozom ve genlerin uzlamsal yerleşiminin de önemli bir etken oldugu bilinmesine rağmen, altta yatan mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. Elde edilen veriler biyokimyasal ve biyofiziksel desteklere ihtiyaç duymakta, verilerin çoğu somatik hücreleri ihtiva ettiği için germ hücrelerinde meydana gelen yeniden düzenlenmeler hakkındaki veriler nisbeten sınırlı kalmaktadır (25).

2.3.2. Hücresel Stres

Kromozomların uzlamsal düzenlenişi tek başına genomik yeniden düzenlenmelerin oluşması için yeterli olmayıp, DNA kırıklarının oluşması gerekmekte ve bu kırıkların oluşumu hücresel stres ve stres kaynaklı yolakların katkısına bağlı olarak gerçekleşmektedir.

3.2.2.1. Genotoksik Stres

Genel bir ifade ile genom bütünlüğünü etkileyen stres olarak tanımlanan genotoksik stres radyasyon ve kimyasal bileşenleri ihtiva eder. Genotoksik stres DNA içerisinde rastgele kırıkların oluşmasına neden olsa da bazı durumlarda büyük olasılıkla sinyal yolaklarının aşağılarında yer alan gen/mekanizmalarını etkileyerek belirli bölgelerde kırıkların oluşmasına neden olmaktadır (35). Belirli bölgelerde kırıkların oluşmasına dair diğer bir alternatif açıklama ise DNA üzerinde kırılmaya yatkın kırılgan bölgelerin varlığıdır (37).

2.3.2.2. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi ve parçalanmasındaki dengesizlik hücreler arası ROS seviyesinin artmasına ve dolayısı ile DNA çift zincir kırıkları ile sonuçlanan oksidatif strese neden olur. Yaklaşık olarak her gün $2x10^4$ adet DNA'ya zarar veren durumlar vuku bulmakta ve çoğunluğu ROS kaynaklı olarak meydana gelmektedir (38). Normal hücrelerde oksidatif stres çoğunlukla mitokontri ile sınırlandırılmış olup bu

durum ROS kaynaklı genomik DNA zararını azaltmaktadır. ROS'un artan üretimi direkt olarak genomik yeniden düzenlenmeler ile doğrudan bağlantılı olup Kseroderm pigmentosum, Bloom sendromu ve Ataksi-talanjiektazi gibi genomik instabilite (DNA tamir anomalileri) sendromları ile doğrudan bağlantılıdır (39).

2.3.2.3. Replikasyon Stresi

Replikasyon stresi yavaş ilerleme, gecikme veya replikasyon çatalının çökmesi gibi yeterli olmayan DNA replikasyonu ile sonuçlanan durumlar ile ilişkilidir. Nükleotid öncüleri veya gerekli enzimlerin eksikliği, az-kopya tekrarları (low copy repeats-LCRs) veya sekonder yapının değişmesine neden olan kırılgan bölgeler gibi DNA sekans özellikleri replikasyon stresine neden olabilir. Replikasyon ve transkripsiyonun aynı DNA kalıbı üzerinde meydana gelmesi ve bu iki mekanizmanın birbiri ile etkileşimide replikasyon stresine neden olabileceği düşünülmektedir (40). DNA replikasyonu, trankripsiyonu ve olgun mRNA oluşumunda görev alan ToP1 (DNA topoizomeraz 1) enzimi eksikliği olan memeli hücrelerinde replikasyon çatalının geciktiği ve gen sayısı açısından zengin olan bölgelerde kromozomal kırıkların oluştuğu belirlenmiştir (41).

2.3.3. Transkripsiyon ve DNA Kırıkları

Transkripsiyonun DNA çift zincir kırıkları ile ilişkili olduğuna dair veriler artmakla birlikte, transkripsiyona maruz kalan bölgelerin genomik yeniden düzenlenmelere daha yatkın olduğu bilinmektedir. Örnegin, östrojen sinyalleri, gen promotörlerinde ToP2B (DNA topoizomeraz 2-beta) enzimini göreve çağırmakta ve bu enzim DNA çift zincir kırıklarının oluşması ile traskripsiyonun gercekleşmesini sağlamaktadır (42), benzer durum androjen sinyal yolağında belirlenmiş olup (43) androjen reseptör ve ToP2B enziminin eş zamanlı olarak prostat kanseri öncü lezyonlarında eksprese edildiği bu lezyonlarda *TMPRSS2*/*ERG* (Transmembran proteaz, serine 2/Eritroblast transformasyon-spesifik (ETS) ilişkili gen) yeniden düzenlenmelerinin gerçekleştiği bilinmektedir. Dolayısı ile ToP2B enzimin yeniden düzenlemelerde görev aldığı varsayılmaktadır. Transkripsiyon faktörleri hedef bölgere, DNA kırıkları oluşumunu sağlayan enzimleri taşıyarak genomik yeniden düzenlemelerin oluşmasına katkı sağlayabilir. Hücre kökenine göre değişen transkripsiyon faktörlerinin farklılığı kısmende olsa somatik genomik yeniden düzenlenmelerin hücre tipine göre nasıl farklandığını açıklayabilir. Transkripsiyonun aynı zamanda DNA çift zincir kırıklarının oluştuğu normal biyolojik olaylar olan CSR ve somatik hipermutasyon (SHM)'da da

görev almaktadır (40). Aynı zamanda transkripsiyon faktörleri, kromatin yapısını etkileyerek DNA kırıklarına daha duyarlı hale getirebilir (44, 45).

2.3.4. Hatalı DNA Tamiri ve Rekombinasyon

Sürekli olarak hücresel strese maruz kalınması ile hatalı tamir ya da rekombinasyon sonucu oluşan DNA kırıklarının geri dönüşümü yoktur. Örneğin, her gün hücrede 10 tane çift zincir kırıklarının oluştuğu belirlenmiştir (46). Bu kırıklar hücrenin sahip olduğu ayrıntılı DNA hasar cevabı ve tamir mekanizmaları tarafından etkili bir şekilde tamir edilir, fakat doğru olarak yapılamayan DNA çift zincir kırıklarının tamiri genomik yeniden düzenlenmelerin vuku bulması ile sonuçlanır. Farklı tamir mekanizmaları farklı özelliklere ve tamir yolağına sahip olduğu için hataları da farklı yeniden düzenlenmelere yol açacaktır, dolayısı ile hangi tamir yolağının hangi durumlarda kullanıldığının ve buna etki eden mekanizmaların da göz önünde bulundurulması önemlidir.

Klasik ve Alternatif Homolog Olmayan Rekombinasyon (NHEJ): NHEJ (non-homologous end joining) tamir mekanizması DNA çift zincir kırık tamir mekanizmalarından olup, kırık DNA uçlarını biraraya getirir ve bu durum nükleotid kayıp ve kazanım mutasyonları ile sonuçlanabilir (46). Homolog rekombinasyondan farklı olarak hataya yatkın olan bir yolak olmasına rağmen çok hücreli ökaryotlar tarafından oldukça yaygın olarak kullanılan bir tamir mekanizmasıdır ve olasılıkla iyonize radyasyonun neden olduğu çift zincir kırıklarının tamirinde kullanılır. NHEJ klasik (C-NHEJ) ve alternatif (A-NHEJ) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Her ne kadar oluşan çift zincir kırıkları etkin olarak C-NHEJ tarafından tamir edilsede, kırıkların aynı hücrede iki veya daha fazla bölgede oluşması hücrede kromozomal translokasyonların oluşmasına neden olmaktadır (47). C-NHEJ yolağı translokasyonu baskılamakla birlikte homolojiye ihtiyaç duymadan aynı kromozomda yer alan kırıkların tamirinden sorumludur. Nisbeten hataya daha meyilli ve mikrohomolojiye bağlı olan A-NHEJ tamir mekanizması kromozomal translokasyonların oluşmasında primer role sahip görünmektedir (48, 49). C-NHEJ eksik olduğu durumlarda A-NHEJ'nin kısmi olarak CSR esnasında oluşan kırıkları tamir ettiği fakat VDJ rekombinasyon esnasında oluşan kırıkları tamir etmediği belirlenmiştir (50, 51). Diğer taraftan A-NHEJ komponentleri ve C-NHEJ aktif olmadığı durumlarda A-NHEJ'nin nasıl aktif hale geldiği hakkındaki bilgiler sınırlıdır.

2.3.4.1. Allelik ve Allelik Olmayan Homolog Rekombinasyon

Homolog rekombinasyon (HR) diğer bir ismi ile gen konversiyonu DNA çift zincir kırık mekanizmalarından olup kırığın tamir edilmesi için kalıp dizide yer alan bilgi kullanılır. NHEJ'den farklı olarak HR hata payı oldukça azdır ve mitoz ve mayoz bölünmenin S ve G2 fazları esnasında da doğal olarak meydana gelir. Genetik veriler HR, kopan replikasyon çatalının tamirinden sorumlu primer mekanizma olduğunu göstermektedir. HR, senteze bağlı iplik bağlanması (synthesis-dependent strand annealing; SDSA) veya çift zincir kırık tamiri (double strand break repair; DSBR) yolakları tarafından tamamlanabilir (52, 53). HR'de meydana gelen anomaliler allelik diziye ihitiyaç duymayan sadece sekans benzerliklerini temel alan allelik olmayan homolog rekombinasyonun (NAHR) kullanımına neden olabilir (54). *Alu* elementler, retrotranspozon L1 element ya da yalancı gen gibi LCR'ler kalıp dizi olarak görev alabilir. Dolayısı ile farklı tamir mekanizma anomalileri somatik ve germ hücre genomik yeniden düzenlenmelerine yol açabilir. Örnegin, NHEJ genel olarak somatik hücre mutasyonlarına neden olurken, NAHR daha çok kalıtılan genomik yeniden düzenlemelere neden olmaktadır. Bunun muhtemel nedeni, NHEJ'nin somatik hücrelerin bütün basamaklarında meydana geliyor olmasına rağmen kalıtsal genomik yeniden düzenlenmelerin çoğunlukla mayotik hücrelerde meydana geliyor olması gerekir ki burada aktif olarak var olan sistem NAHR'dir (25).

2.3.4.2. Antijen Reseptör Farklanmasında Yer Alan Enzimler

Somatik hücreler antijen reseptör farklılaşmasının temini için gerekli olan enzimlere sahiptir dolayısı ile bu enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen anomalilerin patolojik genomik yeniden düzenlenmelere neden olması olasıdır. VDJ rekombinasyon, rekombinasyonu aktive eden genler (recombination-activating genes, RAG) tarafından çift zincir kırıklarının oluşması ile başlatılır. RAG kompleks, V, D veya J segmentlerinin yakınlarında yer alan ve spesifik dizi olan rekombinasyon sinyal sekans (RSS)'ına bağlanır. Bu DNA kırıklarının oluşmasını tetikler, oluşan kırıklar C-NHEJ tarafından tamir ve yeniden düzenlenmiş gen segmenti oluşumu ile sonuçlanır. Aktivasyon indüklenen sitidin deaminaz (activation-induced cytidine deaminase, AID), aynı zamanda prostat kanserinde belirlenen kromozomal translokasyonlardan sorumlu olduğu bilinmektedir (35), fakat RAG ve AID tarafından tetiklenen ve yalnış bölgelerde meydana gelen DNA kırık oluşum mekanizmaları net olarak bilinmemektedir.

2.3.5. DNA Sekans ve Kromatin Özellikleri

2.3.5.1. B-DNA Olmayan Yapı

Bütün DNA dizileri genom bütünlüğüne eşit oranda katkı yapmamakta bazı diziler DNA kırık ve DNA polimeraz hatalarına (slippage) daha yatkın olmaktadır. Adenin (A) ve timin (T)'ce zengin kırılgan bölgeler ya da DNA kırıklarına oldukça yatkın olan CGG tekrarlarının özellikle replikasyon stresine karşı duyarlıdır (55, 56). B-DNA olmayan Z-DNA (sol el heliks), krusiform DNA, H-DNA (tripleks DNA), tetrapleks DNA ve kaygan yapı (slipped structure) DNA'nın, B-DNA olanlara oranla DNA kırık oluşumlarına daha yatkın olduğu bilinmektedir (57, 58).

2.3.5.2. CpG Bölgeleri

CpG bölgeleri hücrenin kökeni ve basamağına bağlı olarak kromozomal translokasyon olasılığını arttırdığı ileri sürülmektedir (59). CpG adacıkları insan genomun sadece %1 kısmını oluşturmakla birlikte pro-B ve pre-B lenfositlerde meydana gelen kırıkların %40-70'inden sorumludur. Diğer taraftan bu durum lenfoid-miyeloid öncülerinde ya da olgun B lenfosit ve T lenfosit hücrelerinde gözlenmemiştir (59).

2.3.5.3. Tekrarlayan Elementler

Yaklaşık olarak insan genomunun yarısı tekrarlayan elementlerden oluşmaktadır ve son zamanlarda yapılan çalışmalar LINE-1 ve *Alu* elementlerin genomda meydana gelen yapısal varyasyonların major kaynağı olduğu belirlenmiştir (60-63). Alu ve LINe-1 elementleri NAHR için kalıp görevi görür veya genomik yeniden düzenlenmeler de alternatif model için mikrohomolojiyi sağlar.

2.3.5.4. Kromatin Modifikasyonları

Bazı epigenetik modifikasyonlar da aynı zamanda genomik yeniden düzenlenmelerin olasılığını arttırabilir. Örneğin, RAG kompleksinin, dördüncü lizin amino asitinde trimetile (H3K4me3) olan histon 3'e *iv vitro* ve *in vivo* olarak bağlandığı bilinmektedir (64, 65) ve bu bağlanma olasılıkla RAG kompleksinin aktif bölgesinde konformasyonel değişikliklere neden olarak RAG'ın katalitik kapasitesini (turnover number) kabiliyetini arttırmaktadır (66). Bir diğer örnek, PRDM9 (PR domain zink finger protein 9)'un sekans spesifik mayotik rekombinasyonun major belirleyici olduğu belirlenmiştir (67). H3K79me'nin rekombinasyon açısından aktif bölge olduğu buna rağmen metile olmayan formunun rekombinasyon açısından sessiz bölge olduğu belirlenmiştir (68).

2.4. Genotip-Fenotip İlişkisini Etkileyen Faktörler

Birçok kalıtsal hastalıkta aynı mutasyonu taşıyan bireylerde mutant olan genin ifade edilmediği, ifade edildiğinde dahi bireyler arasında farklılık gösterdiği bilinmektedir. Bu durum penetrans ve ekspresivite (gen ifadesi) tanımlarının oluşmasına neden olmuş ve penetrans ve ekspresiviteyi kontrol eden mekanizmaların anlaşılması hastalık aşamalarının öğrenilmesi ve buna bağlı olarak verilecek olan erken tedavi ve genetik danışmada oldukça önemli konuma gelmiştir. Penetrans, ilişkili mutasyon ve genotipe bağlı olarak meydana gelen klinik ve fenotipik özelliklerin bireyde meydana gelme yüzdesi olarak tanımlanır (69). Tam penetrans, sahip olunan mutasyon ve genotipe bağlı olarak hastalıkla ilgili beklenen klinik ve fenotipik bulguların bireyde gözlenmesini ifade ederken, inkomplet ya da indirgenmiş penetrans mutasyona ve genotipe bağlı olarak beklenen fenotipik/klinik bulguların bireyde gözlenmemesi ya da daha az klinik bulgular vermesi durumudur (70). Düşük penetrans, alleller bazen belirlenebilen seviyede semptomlara neden olurken, yalancı-inkomplet penetransda yapılan klinik muayinelerin tam olmaması ya da klinik muayinenin yapıldığı yaş itibari ile henüz hastalık bulgularının açığa çıkmaması durumu kaynaklı olarak ortaya çıkabilir. Bu durum ilk kuşakta dominant hastalıktan etkilenen bir kaç çocuğun sağlıklı olduğu ailelerde germ-hücre mozaizimine bağlı olarak da görülebilir (71).

Variable ekspresiviti (değisen ifade) bireylerde hangi genotipin ifade edildiğine bağlı olarak değişiklik gösterebilecek kadar geniş bir anlam ifade edebilir. Aynı mutasyonu taşıyan aynı aileye ait bireyler dahi hastalığın şiddeti ve gösterdiği klinik bulguları doğrultusunda farklılıklar sergileyebilir (72).

Sağlıklı bireyler dahi kısmen ya da tamamen zararlı olma potansiyeline sahip fakat hiç bir hastalık belirtisine neden olmayan varyantları genomlarında ihtiva edebilir (73). Bu varyantlar, üzerinde bulunduğu proteine zarar verebilir fakat bu protein bireyin hastalığa neden olması için etmen değildir ya da tek resesif bir allelin veya dominant bir mutasyonun semptomatik olmayan taşıyıcısı olabilir ya da klinik bulgular orta veya sağlıklı bireyler arasında belirlenen varyasyon sınırında olabileceği gibi ilerleyen yaş ile klinik bulgu vermeye başlayabilir (69).

Her bireyde, 40-85 tane değişimin homozigot olduğu toplamda 281-515 arasında değişen kayıp değişimlerine sahip olduğu ve bu değişimlerin istatistiki olarak yüksek olasılıkla gen ürünlerine zarar vermesi beklenmektedir. Bu çalışmaya bağlı olarak

herbir sağlıklı bireyin yaklaşık 80 tane geninin her iki allelinin de ağır bir şekilde zarar görmüş olması veya inaktive olması gerekirken, bu durum aynı zamanda değişime bağlı olarak gen ve proteine olan zarar ve hastalık etmeni olup olmama arasındaki zıtlığın büyüklüğünüde ortaya koymaktadır (69).

2.4.1. Penetransı Etkileyen Faktörler

2.4.1.1. Dominant ve Resesif Durumlarda İnkomplet Penetrans

Genel olarak otozomal dominant kelimesi, mutasyon açısından homozigot olan bireylerin aynı mutasyon açısından heterozigot olan bireyler ile aynı veya benzer klinik bulgular vermesini ifade ederken bu duruma en belirgin örnek bir allelinde meydana gelen belirli sayıdaki CAG tekrarına bağlı olarak meydana gelen Hungtinton (HTT) hastalığıdır. CAG tekrarı hastalığın başlangıç yaşı hakkında bilgi verici olurken bu durum için ikinci allelin aynı mutasyona sahip olup olmadığı göz ardı edilir (74). Diğer taraftan pratikte bu durumun her zaman böyle olmadığı ve heterozigot durumlara oranla homozigot bireylerin daha ağır klinik bulgulara maruz kaldığı dominant hastalıklarda belirlenmiştir (75).

Bu durum özellikle düşük penetrans mutasyonlar için geçerlilik kazanmaktadır. Voltaj bağımlı sodyum kanalı tip IV alfa (sodium channel, voltage gated, type IV alpha subunit, *SCN4A*) ve klorid kanalı protein1 (chloride channel protein 1, *CLCN1)* genlerinde meydana gelen ve kas iyon kanal bozuklukları (muscle channelopathies)'a neden olan durumlar otozomal dominant olarak kalıtılmakla birlikte, homozigot sodyum kanal mutasyolarına sahip olan bireylerde amiyotoni konjenita (*SCN4A*, I1393T), hipokalemik periyodik paraliz (*SCN4A*, R1132Q) ve miyotoni konjenita (*CLCN1*, G190S, I556N, A313, I556N) bu mutasyonlar açısından heterozigot olan bireylere oranla daha ağır klinik bulgulara neden olmaktadır (76-78). Buna ilave olarak yukarıda belirtilen mutasyonların azalan (reduced) penetrans gösterdiğide belirlenmiştir. Azalan veya inkomplet penetrans aynı zamanda otozomal resesif hastalıklarda da belirlenmiştir. Bu duruma en iyi örnek *HFE* (insan hemokromatosis proteini) geninde bulunan C282Y (rs1800562) mutasyonudur (79). Y282 homozigot genotipi yaklaşık olarak Kuzey Avrupada her 200 kişiden birinde mevcut olsada yaklaşık %80-90 arası kalıtımsal hemokromatozisden sorumludur (80, 81). Bunun nedeni bu mutasyonun her ne kadar biyokimyasal olarak (örneğin demir birikimi) nisbeten yüksek penetras göstermesine rağmen klinik penetransı düşüktür (82). Mevcut veriler bu mutasyon açısından

homozigot bireylerin %38-50'sinin demir aşırı yüklemesine maruz kaldığı, %10-25'inin ise hemokromatozis-ilişkili morbiditiye maruz kaldığı belirlenmiştir (83). Diğer taraftan, yapılan bu istatistiki çalışmalar Y282 homozigot bireylerde karaciğer hastalıkları oranının erkek hastalarda %24-43 arasında olurken, kadınlarda bu oranın 1-%14 arasında olduğu belirlenerek penetrans ve cinsiyet arasındaki farklılığıda açığa çıkarmıştır (84).

2.4.1.2. Mutasyon Tipi ve Penetrans

İnkomplet penetrans mutasyon tipine bağlı olarak meydana gelebilir. Aynı gen için bazı mutasyonlar tam penetransa neden olurken, bazıları inkomplet ve çok düşük penetrans gösterebilmektedir. Örneğin, kistik fibrosize neden olan CFTR gen mutasyonlarından olan F508, rs113993960 yüksek penetransa sahip iken R117H (rs78655421) mutasyonu kistik fibrozise neden olan mutasyonlar listesinden çıkartılması önerilecek kadar oldukça düşük penetransa sahiptir (85). *Col3A1* geninde protein üretimini engelleyen null mutasyon, hatalı protein üretimine neden olan yanlış anlamlı ve alternatif kesim bölgesi mutasyonlarına göre daha düşük penetransa sahipdir (86). Tam tersi durum ise *BMPR2* (Kemik morfogenetik protein reseptör tip II) yanlış anlamlı değişimleri taşıyan bireyin, anlamsız değişimlere (nonsense mutasyon) neden olan mutasyona göre daha erken ve ağır klinik veren pulmoner hipertansiyone neden olur (87).

Bazı genetik hastalıklarda ise azalan penetrans aynı zamanda bireyin sahip olduğu genetik alt yapısına da bağlı olabilir. Bu duruma örnek *RET* geni mutasyonu, Hirschsprung hastalığı (HSCR) kalıtımını açıklamada yeterli iken, genom tarama analizleri ile 9q-31 yeni duyarlılık lokusu olarak belirlenmiştir (88).

2.4.1.3. Gen İfadesindeki Varyasyonlar ve Penetrans

Aynı aileye ait bireylerde dahi meydana gelen genlerin farklı seviyelerde ifade edilmesi patolojik mutasyonlarda penetransı etkileyen faktörler arasındadır (89). İnsan genomunun fonksiyonel yapısına dair yapılan son zamanlardaki çalışmalar genin ifadesini etkileyen düzenleyici bölgelerin kontrol ettiği genden daha uzak mesafelerde alabileceğini ve bu durum *cis* olarak etki eden allelerin varlığını ortaya çıkarmıştır (Encode-Project-Consortium 2007). *Cis* olarak etki eden elementler genin ifadesi için gerekli olan yapısal kısımlarını ifade ederken, *trans* olarak etki eden etmenler proteinler vb olup *cis* olarak etki eden dizilere bağlanarak gen ifadesini kontrol ederler. Gen ifadesindeki farklılık bu bölge ve proteini kodlayan genlerde meydana gelen

mutasyon/polimorfizim kaynaklı olabilir. Mutant ve normal olan allelerin farklı ifade edilmeside aynı zamanda penetransı etkileyen etmenler arasındadır (90). Bireylerde gözlenen aynı genlerin farklı ifade edilmesi aynı zamanda genomda yer alan allelik varyasyonlara ve çevresel faktörlerede bağlı olabilir.

Genom dizileme çalışmaları insan genomunda protein kodlayan genlerde fonksiyon kaybına neden olan birçok varyantın varlığını göstermiştir. İnsan genomu yaklaşık 100 adet fonksiyon kaybına neden olan varyant ihtiva etmekte ve bunlar yaklaşık 20 adet geni tamamen inaktif etmektedir. Bunlardan yaklaşık 26 tanesi nadir ve zararlı olmakla birlikte 21 tanesi ağır hastalık nedeni olan varyantlardandır. Bunların haricinde yaygın olarak bulunan ve fonksiyon kaybına neden olan varyantlar bireyde anomaliye neden olabilmek açısından gerekli olmayan genlerde belirlenmiştir (91).

2.4.1.4. Penetrans ve Cinsiyet

Cinsiyet ile sınırlı olan hastalıklar cinsiyete bağlı olarak penetrant olan ya da olmayan otozomal hastalıkları kastetmektedir. Erkeklerde görülen erken puberte (precocious puberty)'ye 2. kromozom üzerinde lokalize *LCGR* (luteinizing hormon / koriogonadotropin reseptör) genindeki heterozigot mutasyon neden olurken, aynı mutasyon dişi bireylerde aynı fenotipe neden olmamaktadır. Cinsiyet steroid hormonlarına duyarlı olan genlerin düzenlenişindeki farklılıkların cinsiyete bağlı penetrans değişikliğine neden olabileceği yönündedir (92).

Genomik imprinting, aktarılan genin hangi ebeveynden geldiğine bağlı olarak gen ifadesindeki değişimi tarifte kullanılan terim olup, allel spesifik olarak maternal ya da paternal genin epigenetik modifikasyonu kaynaklıdır (93). *IGF2* gen ifadesi bu duruma örnek olup, sadece paternal olarak aktarılan kopya aktiftir ve ifade edilir (94, 95). İnsanda yapılan çalışmalar 200 kadar fonksiyonel genin imprinting kalıtım sergilediği belirlenmiş (96), fakat bunlardan sadece 20 tanesine dair kesin vakalar belirlenmiştir (97).

2.4.1.5. Epigenetik Değişimler ve Penetrans

Çevresel ve rastgele faktörler DNA dizisi üzerinde değişikliğe neden olmadan gen ifadesini ve dolayısı ile penetransı etkileyebilir (98). Bu duruma örnek hastalığın X kromozomuna bağlı olduğu durumlarda X inaktivasyonu verilebilir. Skewed-X inaktivasyonu, *EBP* (emopamil bağlanma proteini) gen üzerinde meydana gelen

mutasyon kaynaklı X'e bağlı dominant olarak kalıtılan kondrodisplazi punctata hastalığında dişi bireylerde değişen penetransa neden olabilir (99).

Gen ifadesini etkileyen farklı epigenetik mekanizmalar aynı zamanda obez olma riskini etkileyebilir, bu duruma en iyi örnek imprining gen olan ve uniparental dizomi özelliğine sahip olmasından dolayı, fenotipik anomalilere neden olan Prader-Willi sendromudur (100).

2.4.1.6. Gen-Çevre Arasındaki Etkileşim ve Penetrans

Çevresel faktörler kalıtılan hastalıkların etkisini dolayısı ile penetransı bu hastalıkların ortaya çıkısını engelleme/geciktirme ya da oluşumu tetikleme/şiddetini arttırma gibi olumlu ve olumsuz yönde etkileyebilir. Çevresel etmenlere, cinsiyet, beslenme alışkanlığı, ilaç, alkol kullanımı, metabolik sendromlar ve fiziksel aktiviteler verilebilir (101). Bu duruma örnek, *BRCA1* (meme kanseri 1, breast cancer 1) mutasyonu taşıyan İranlı kadının, aynı mutasyonu taşıyan Aşkenaz Yahudilerine oranla düşük penetrans sergilemesi verilebilir (102). Dolayısı ile bu durumun nedeni genetik temele ve farklı haplotiplere bağlı olabileceği gibi çevresel ve kültürel farklılıklara da bağlı olarak ortaya çıkmış olabilir (103).

2.4.1.7. İlerleyen Yaş ve Penetrans

Bazı hastalık mutasyonlarının hastalığa neden olma olasılığı ilerleyen yaş ile orantılı olarak artmaktadır. Buna örnek olarak *MYBP3* (miyozin bağlanan protein C kardiyak, miosin binding protein C, cardiac) gen mutasyonunun neden olduğu hipertrofik kardiyomiyopati (104, 105) Emery-Dreifuss kas distrofisi (70) ve *MC4R* (melanokortin reseptör 4) gen eksikliğine bağlı ailesel obezite (106) verilebilir. *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2) geninde olduğu gibi bazı durumlarda ise belirli mutasyonların neden olduğu klinik penetrans ilerleyen yaş ile dramatik olarak değişiklik gösterebilir. *LRRK2* geni p.R1441G mutasyonunun parkinsona neden olma olasılığı 65 yaşına kadar %12.5 iken, 80 yaşına kadar bu olasılık %83'e yükselmektedir (107).

2.4.1.8. Oligogenik Kalıtım ve Penetrans

İnkomplet penetrans, hastalığın ortaya çıkmasında birden fazla genin mutasyona uğramasını gerektirmesinden dolayı kaynaklabilir (69). Her ne kadar kansere olan kalıtımsal yatkınlık monogenik olsada, birçok durumda hastalığın ortaya çıkması için oligogenik etiyoloji sergilemektedir (108-116). Amyotrofik lateral skleroz hastalarında

FUS (fused in sarcoma), *TARDB* (transaktif respons DNA bağlanma proteini), *ANG* (angiogenin precursor), *SOD1* (süperoksit dismutaz 1) gen mutasyonlarına ilave olarak *C9orf72* (kromozom 9 açık okuma çerçevesi, chromosome 9 open reading frame) geninde tekrar artış mutasyonları belirlenmiştir (117). Diğer bir örnek ise yaş ile bağlantılı olarak riskin artması ve makular dejenerasyonun meydana gelebilmesi için en az 4 farklı gen *CFB* (komplement sistem protein faktör B) (p.R32Q, rs641153), *C2* (p.E318D, rs9332739), *CFH* (komplement sistem protein faktör H) (p.Y402H, rs1061170) ve protein kodlamayan varyant rs1410996] ve *ARMS2* (yaş ilişkili makülopati duyarlılık protein 2) (p.A69S, rs10490924) üzerinde nisbeten yaygın olan beş farklı polimorfizmlerin meydana gelmesi gerekmektedir (118).

2.4.1.9. Digenik Kalıtım ve Penetrans

İki genli kalıtım, hastalığın tam klinik bulgu vermesi için farklı iki gende meydana gelen mutasyonların bibirleri ile iletişim halinde olması ve bireyin bu iki mutasyona da sahip olması gerekmektedir. Farklı iki gen için heterozigot olan bireylerde tam penetrans gözlenirken, sadece bir gen açısında heterozigot olan bireye non-penetrans, azalan ya da daha az severe (ağır) bir fenotip belirlenmiştir (69, 119). Digenik kalıtım multimerik proteinin farklı alt birimlerini kodlayan genler (*PRpH2* ve *ROM1* vb), oligomerik kompleks komponentleri oluşturan genler (*KCNJ* 10 ve *SLC26A4* vb) gibi veya iletişimleri ile yapısal komponentleri oluşturan proteinleri kodlayan genler (polisistin 1ve2 vb) olabilir. Diğer taraftan, digenik kalıtım *PROK2* (prokinetisin 2) ve onun reseptörü olan *PROKR2* (prokinetisin 2 reseptör) gibi reseptör/ligand bileşenlerini etkileyen mutasyonları da ihtiva edebileceği gibi bu proteinler aynı sinyal yolağında fakat farklı basamakların gerçekleşmesinden de sorumlu olabilir (69).

Pratikte bu durum gerçekten bu iki mutasyonun fonksiyonel bir bütünün parçası mı (120) olduğu yoksa kalıtımsal olarak beraber mi kalıtıldığı (121-123) her zaman tam olarak bilinmemektedir. İlk durumda hastalık fenotipinin oluşması için her iki geninde mutasyona uğraması gerekirken, ikinci durumda her iki mutasyonunda birlikte aktarılması klinik fenotipi kötüleştirebilme potansiyeline sahipken, var olan herbir mutasyonun neden olduğu klinik fenotip kendine özgüdür.

2.4.1.10. Modifiye Eden Genler ve Penetrans

Tek gen hastalıkları primer olarak bir gen üzerinde meydana gelen mutasyon kaynaklı olmasına rağmen, farklı lokuslarda yer alan bir veya daha fazla sayıdaki kalıtılan

modifiye edici genlerin varlığı ve bunların mutasyona sahip olup olmaması da fenotipdeki varyasyonlara ve hastalığın şiddeti üzerine etki etmektedir (69). Dolayısı ile hastalığın patolojik yolaklarında, fenotipik varyasyonlarında ya da hastalığın şiddetinin değişmesinde rol alan genler modifiye edici genler olarak tanımlanmaktadır (124).

Bu modifiye edici genler, mendeliyen kalıtım gösteren hastalıklarda penetrans, dominans, pleitrofi veya genlerin ifadesi üzerinde değişikliğe neden olabilirken aynı zamanda multigenik hastalıklarında oluşmasında etkili olabilir. Fakat, özel olarak dizayn edilen organizmalar haricinde kantitatif özellik genleri ve modifiye edici genlerin belirlenmesi ve birbirinden ayrılması zordur.

İnsanlarda modifiye eden genlerin varlığı genellikle belirlenen klinik varyasyonları açıklamada kullanılmasına rağmen (125, 126) kompleks mekanizma ve birden fazla faktörlerin varlığının neden olduğu klinik varyasyonları aydınlatamamakla birlikte olukça az sayıda modifiye edici gen belirlenmiştir (127).

Modifiye edici genlerin varlığı aynı zamanda gen etkileşimlerinin moleküler ve fonksiyonel temelini oluşturmakta ve bu durum hastalığın tedavi edilmesi, hastalığın ortaya çıkısını önlemede, genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişen dengenin korunmasında yeni keşiflere neden olabilir (124, 128).

Kistik fibrosiz hastalarında sadece *CFTR* (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) genindeki mutasyonun belirlenmesi klinik fenotipin tahmin edilmesinde yeterli olmayıp, klinik varyasyonlara neden olan en az 7 tane modifiye edici gen belirlenmiştir (129). Modifiye edici genler arasında mannoz binding lektin üreten *MBL2-O* (*MBL2* genin varyant alleli), TGF (transforming büyüme faktörü), *SERPINA1* (α1-antitiripsin)'nın kanda dolaşım miktarını etkileyen *TGFB1* (transforming büyüme faktörü beta 1) gen promoter polimofizmi (-509) ve 10. kodonda yer alan +869 değişimi (130, 131), ADRB2 (*B2* adrenergik reseptör) (132), glutathione s-transferaz (*GSTM1*) (133), *NOS3* (nitrik oksit sentaz) (134), *TNF* (tümor nekrosiz faktör) ve *GCLC* (glutamatsistein ligaz)'dir (135).

2.4.1.11. Koruyucu Alleller ve Penetrans

Heterozigot üstünlüğü (heterozigot avantajı), heterozigot genotipin homozigot resesif veya homozigot dominant genotipe oranla daha yüksek fitnese sahip olmaları olarak tanımlanır. Tek lokusa bağlı olarak heterozigot üstünlüğünün ortaya çıktığı durumlar

overdominans olarak bilinir (136). Polimorfizim heterozigotluğun seleksiyonu ile devam ettirebilir ve bu durum bazı genetik varyasyonların nasıl meydana geldiğini açıklamakta kullanılmaktadır. Aynı allel için homozigotluğun dezavantaj olduğu durumlarda heterozigotluğun avantaj ya da dezavantaj sağlaması buna en yaygın örnek olarak verilebilir. Heterozigot üstünlüğüne en iyi anlaşılmış örnek orak hücre anemisinde rol alan gen verilebilir. Otozomal resesif olarak kalıtılan ve orak hücre anemisine neden olan gen mutasyonu açısından heterozigot olan bireyler, sıtma hastalığına karşı dayanıklılık göstermektedir (137).

2.5. Kolestrol Alımı, Depolanması ve Hücreler Arası Taşınım

Kolestrol bütün steroid hormonların öncüsü olup, insan adrenal ve overleri asetatdan *de novo* (138) olarak kolestrol sentezleme yeteneklerine rağmen gerekli kolestrolün büyük bir çoğunluğu besin ile alınan kolestrolün plazma düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) tarafından taşınması ile temin edilir (139). Hücereler arası kolestrol ekonomisi kolestrol ve yağ asitlerinin sentezinde görev alan genlerin düzenlenmesinden sorumlu bir grup transkripsiyon faktöründen oluşan "sterol düzenleyici eleman bağlayıcı proteinler (SREBP)" tarafından kontrol edilir (140).

Yeterli seviyedeki LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein), kolestrol sentezinde anahtar basamak olan HGM-CoA (3-hidroksi-3-metilglutarik koenzim A) redüktazı baskılar. HMG-CoA redüktaz, LDL reseptör sayısı ve kapasitesi ACTH (adrenallerde adronokotrikoit hormone), yumurtalıkta ise FSH (follikül uyarıcı hormon) ve LH (lutenize edici hormonun) tarafından sağlanır. Steroidojenik hücreler, LDL kolestrol esterlerini depolamak ya da steroid biyosentezinde kullanılmak üzere serbet kolestrole dönüştürmek için reseptör aracılıklı endositosiz ile alır (141). Kolestrol, açil CoA:ACAT (acil-koenzim A: açiltransferaz) enzimi tarafından esterlenip yağ damlaları halinde depolanır. Yağ damlalarının kullanımı, HSL (hormon-sensetif lipazın) aktivasyonu tarafından gerçekleşir. ACTH, HSL'yi aktive ederken, ACAT'ı inhibe ederek steroid sentezi için serbest kolesterolün ulaşılabilirliğini arttırır (142). Kolestrol esterlerinin depolanması zıt fonksiyonlara sahip iki enzim (kolestrol esteraz ve kolestrol sentetaz) tarafından kontrol edilir. LH ve ACTH serbest kolestrolün ulaşılabilirliğini arttırmak için esteraz enziminin aktivitesini arttırırken, sentetaz enzimini inhibe etmektedir.

2.5.1. Mitokondriye Kolesterol Taşınımı

Steroid biyosentezinin ilk basamağı mitokondride yer almaktadır. Kolestrolün OMM (mitokondrinin dış zarına)'ye nasıl taşındığı halen bilinmemekle birlikte bu konuda araştırmalar devam etmektedir (143, 144). Tropik uyarılara karşı StAR (steroidojenik akut düzenleyici protein) akut steroidojenik cevap vererek kolestrolün OMM taşınımında küçük de olsa fonksiyona sahip olduğu bilinmekle birlikte bu proteinin asıl fonksiyonu kolesterolün OMM'den IMM (mitokontriyal iç zara)'ye taşınımıdır. StAR (steroidejenik akut düzenleyici protein), StAR-ilişkili lipid transfer (STAR-T) domainine sahip protein ailesinin tanımlanan ilk üyesi olup birçok metazoan organizmalarda bulunmaktadır (145). Memelilerde hücreler arası lipit taşınımı ve bağlanımında görev alan 15 farklı START domainine (StarD) sahip protein belirlenmiştir (146). Serbest kolestrol neredeyse tamamen çözünmez (insoluble) olup (147) bazı kolestroller veziküler membranlara integre olarak diğer mebranlar ile birleşip kaynaşarak kolestrolün bir hücrelerarası kompartmandan diğerine transferi sağlanabilir fakat buda total kolestrol taşınımına göre oldukça küçük bir role sahiptir (148). SREBP tarafından düzenlenen trasnkripleri belirlemek amaçlı yapılan analizler, StarD4,5 and 6 olmak üzere yapısal olarak StAR proteinine oldukça benzeyen bir grup proteinin tanımlanmasına yol açmıştır ve bu proteinler hücrelerarası kolestrol taşınımda majör role sahip olduğu belirlenmiştir (146). Bu proteinler birbirlerine oldukça bezer cDNA, gen ve protein yapısına sahip olup (149) özellikle StarD4 proteinin kristal yapısı MLN64 (metastatik lenf nodu 64) proteininin, StAR-benzer domaini ile temelde aynıdır (150). StarD4-5, ve 6 proteinlerinin sinyal peptiti ihtiva etmemesi bu protein hedeflerinin spesifik organellerden ziyade sitoplazma ile sınırlandırıldığını sitoplazma içerisinde çözünür olmayan lipitlere bağlanarak su ihtiva eden sitozol içerisinde taşınımını sağlamaktadır.

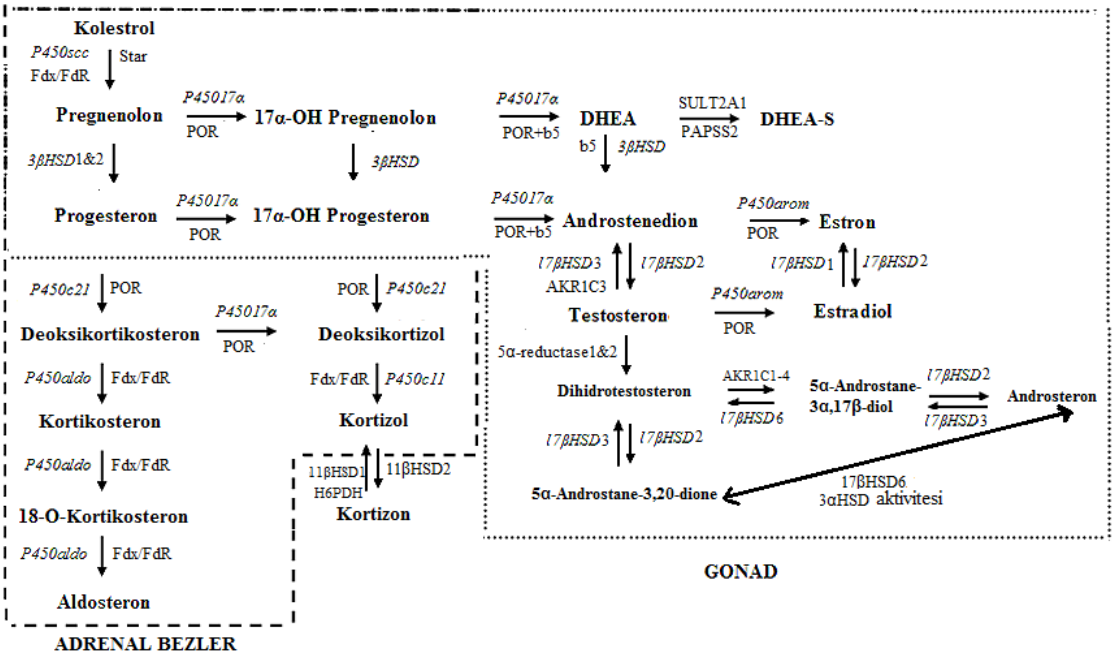
Günümüzde ortak kabul edilen görüş birçok hücre türünde StarD4 ilişkili olan protein grubunun hücre içerisinde herhangi bir yerde lokalize olan kolestrolün (lipit damlası, endoplazmik retikulum) OMM taşındığı yönündedir. Diğer taraftan StAR proteini ise kolestrolün OMM'den IMM'ye taşınımında fonksiyona sahip olduğu fakat bu fonksiyonun sadace sterojenik hücreler ile sınırlı olduğu yönündedir (1).

2.5.2. Kolestrol Sentezi ve Taşınımı ile İlgili Hastalıklar

Genetik anomaliler sonucu steroid biyosentezinin bu erken everesinde meydana gelen hastalıklar bulunmaktadır. Bunlar arasında ALD (aderolökodistrofi) ve steroid sentez ve metabolizmasındaki anomalilerden kaynaklanan Wolman hastalığı, kolestrol ester depo hastalığı ve Smith-Lemli-Opitz sendromu yer almaktadır. Bu hastalıklar primer adrenal yetersizliğine neden olmakla birlikte, fetoplasental gelişim anneden temin edilen kolestrol kaynağı ile sağlanabilmektedir (151).

2.6. Doku Spesifik Steroid Sentez Yolakları

Steroid sentez yolağı nisbeten az sayıda steroidojenik enzimleri ihiva etmesine rağmen dokulara göre değişiklik gösteren ifadeleri, substrat ve kofaktörlerin ulaşılabilirliği herbir steroidojenik dokuda görülen geniş varyasyonlara neden olmaktadır (152). Steroidojenik özelliği ihtiva eden hiçbir hücre steroid üretiminde görev alan enzimlerin tamamını ihtiva etmemesine rağmen hücreler arasındaki bağlantı Şekil 2.3'de görülmektedir.

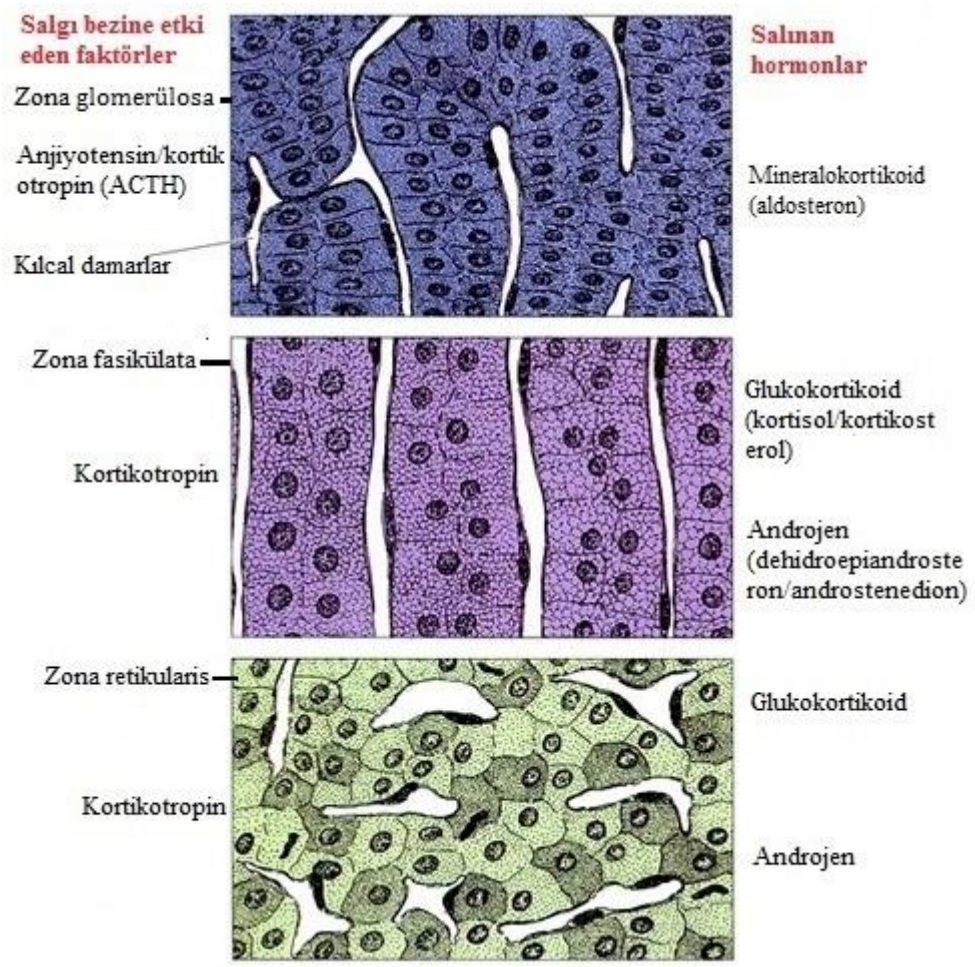


Şekil 2.3. *Major Steroid Hormon Biyosentez Yolağı. Yolakta Yer Alan Anahtar Enzimler ve Enzim Kofaktörleri Ok İşareti İle Gösterilmiştir.*

Kaynak: Miller and Auchus, 2011: 32 (1)'den modifiye edilmiştir.

2.6.1. Adrenal Bez Steroid Hormon Sentezi

Endokrin bezler içerisinde yer alan "adrenal (sürrenal) bezler" çeşitli hormonların sentezinden sorumludur. Böbrek üzerinde yer alan adrenal bezler fonksiyon ve yapısını doğrudan etkileyecek katmanlardan oluşmaktadır. Herbir adrenal bez, steroid üreten ve medullayı çevreleyen kortekse sahiptir. Medulla, sinaptik nöronlar ile nöral ektodermden köken alır ve sempatik sinir sistemi ile direkt ilişkili olan kromaffin hücrelerinden oluşmaktadır. Adrenal korteks, mezoblastik ürogenital ridge'den köken alır ve mikroskopik görüntü/ fonksiyonuna göre zona glomerülosa, zona fasikülata ve zona retikülaris olmak üzere üç ayrı katmandan oluşmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. *Adrenal Kortekse Ait Katmanlar, Katmanlara Özgü Salınan Hormonlar ve Bu Hormonlar Üzerine Etki Eden Faktörler*.

Kortekste üretilen kortikosteroidler etki mekanizmalarına göre glukokortikoid, mineralokortikoid ve cinsiyet hormonları olarak sınıflandırılmaktadır. Adrenal steroid biyosentezi quantitatif olarak *CYP11A1* (kolestrol-yan zincir kesim enzimi, *P450c11A*) ve *STAR* enzimleri tarafından kontrol edilir.

Adrenal zona glomerülosa, anjiotensin II reseptör ve *CYP11A1* eksprese etmesi ve *P450c17* eksprese etmemesi ile 3 farklı özelliği ile karakterizedir. Zona glomerülosa, renin/anjiotensin tarafından düzenlenen aldosteron üretiminden sorumludur. Buna karşılık adrenal zona fasikülata diğer taraftan anjiotensin II reseptör ve *CYP11A1* eksprese etmemekte fakat *MC2R* (ACTH reseptörü) ve *P450c11B* (*CYP11B1*) eksprese etmektedir. *CYP11B1,* 18-hidroksikortikosteronu aldosterona dönüştüremez. Diğer taraftan minimal düzeyde kortikosteronu 18-hidroksikortikosterona dönüştürme yeteneği vardır (153). Her iki katmanda; zona fasikülata ve zona glomerülosa *P450c21* (*CYP21A2*) genini eksprese etmekte ve kortisol sentezine olanak sağlamaktadır. Diğer taraftan *P450c17* (*CYP17A1*) geni sadece zona fasikülata da eksprese olmaktadır. Zona fasikülata çok az miktarda sitokrom b5 eksprese (154) etmekte ve dolayısı ile 17-hidroksilaz aktivitesine sahipken çok az miktarda 17,20-liyaz aktivitesi göstermektedir. Böylelikle zona fasikülatada ACTH kontrolünde kortizol ve kortikosteron olmak üzere iki farklı glukokortikoid, fakat çok az seviyede DHEA (dehidroepiandrosteron) sentezi gerçekleşmektedir. Ağır *CYP17A1* mutasyonuna sahip hastalarda kortizol sentezinin olmamasına buna rağmen artan kortikosteron üretimini (155) bu hastalarda kortizol eksikliğine rağmen glukokortikoid eksikliği olmamasını açıklamaktadır. Adrenal zona retikularis, *MC2R* (melanokortin reseptör 2) eksperese ederken çok az miktarda *CYP21A2* veya *CYP11B1* eksprese etmekte ve dolayısı ile çok az miktarda kortizol üretebilmektedir. Diğer taraftan zona retikülaris yüksek miktarda *CYP17A1* ve sitokrom b5 (154) eksperese etmekte ve mevcut olan *b5, CYP17A1*'in 17,20-liyaz aktivitesini maksimize ederek (156) DHEA üretimine olanak sağlamaktadır. Mevcut olan DHEA çoğunluğu *SULT2A1* (sülfotransferaz 2A) tarafından sülfatlanarak DHEA-S dönüştürülmektedir (157). Zona retikülaris nisbeten az *3βHSD2* eksprese etmekte ve fazla miktarda DHEA üretimine olanak sağlamaktadır. Üretilen DHEA'nın az bir miktarı androstenedion, androstenedionun ise çok az bir kısmı testosterona dönüştürülmektedir. Dolayısı ile hangi zonadan hangi steroid üretimin yapılacağı sahip oldukları enzimler tarafından belirlenmektedir (157).

Andrenal androjen üretiminin düzenlenişi çok az oranda aydınlatılabilmiştir (158). Fetal adrenal yüksek oranda DHEAS üretmesine rağmen, bu androjenin fetusun gelişimde önemli bir konuma sahip olmadığı *P450c17* eksik olan fetusların normal gelişime sahip olmasından dolayı bilinmektedir. Doğumu takiben adrenal tabakalar oluşmaya başlar ve DHEAS üretimi düşük seviyelere ulaşır. Adrenal zona retikülaris yaklaşık 3 yıl sonra morfolojik olarak ayırt edilebilir duruma gelir fakat DHEAS üretimi adrenarşa (7-8 yaş civarı) kadar başlamaz.

Serum DHEAS konsantrasyonu puberte sonrası yükselmeye devam etmekte ve 25-30'lu yaşlarda maksimum seviyeye ulaşmakta ve sonrasında ise azalmaya başlamaktadır (andrenapause) (159). DHEAS seviyesindeki 100 kat değişime rağmen, ACTH ve kortizol seviyesinin değişmemesi, adrenarşa dair yapılan araştırmaların intra-adrenal olaylara odaklanmasına denen olmuştur (158). Adrenarş, 3βHSD akspresyonunun azalması ve *P450c17* ve sitokrom b5 ekspresyonlarının zona retikülarisde artması ile DHEA üretiminin desteklenmesi ile başlar (154). *P450c17*'nin serin fosforilasyonu 17,20 liyaz aktivitesini arttırarak DHEA üretimi desteklemesine rağmen, adrenarşda serin fosrorilasyonunda değişimin olup olmadığı bilinmemektedir.

Gelişmeye yönelik programlanmış faktör ki olasılıkla *IGF-1*, zona retikülarisde hücre çoğalmasına ilave olarak steroid sentez mekanizmalarında teşvik edici role sahip olabilir (158, 160). Zamanından önce meydana gelen adrenarş, insülin direnci ile ilişkili olup, zamanından önce adrenarş olan kız çocukların yetişkin dönemlerinde PKOS olma eğilimleri oldukça fazladır (160-163). PKOS, hirsutizm, virilizasyon, hiperandrojenizm, mestrüal düzensizlik, kronik anovulasyon, obezite, insülin direnci, akandro nigrikans yüksek konsantrasyonda LH ve overyan kist ile karakterizedir (164, 165). Hiperandrojenizm ve insülin direnci primer lezyonlar olarak ortaya çıkmakla beraber diğer belirtiler ikincil bulgular olarak kabul edilmektedir. Kadınlarda PKOS ile hiperandrojenizm overyan ya da adrenal orijinli olabilir (164, 165).

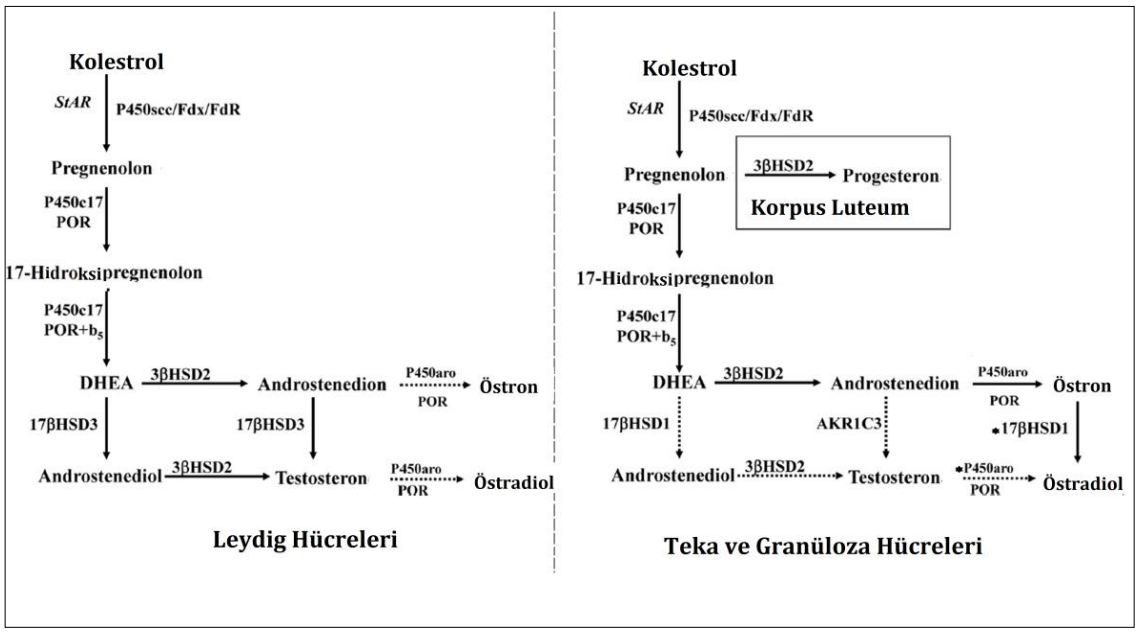
PKOS ile seyreden hiperinsulizm ve insülin direnci insülin reseptör sinyal iletimi seviyesindedir (165). İnsülin reseptörünün β-zincir serin fosforilasyonu insülinin bağlanmasında gerekli olan tirozin fosforilasyonuna engel olmaktadır (166-168). PKO sendromlu bazı kadınların fibroblastta yer alan insülin reseptörlerinde artan serin fosforilasyon belirlenmiştir (165). Bu nedenle serin-treonin kinaz veya onun sinyal iletim yolağında meydana gelen ve fonksiyonunda artmaya neden olan fonksiyon

kazanım mutasyonu (gain of function), *P450c17* ve insülin reseptörü β-zincirinde meydana gelen serin fosforilasyonunu arttırmakta ve dolayısı ile PKOS'da görülen hiperandrojenizm ve insülin direncine neden olmaktadır (158, 160, 169, 170).

2.6.2. Gonadal Steroid Biyosentez Yolağı

Testosteronun testikülerdeki sentez yolağı uyarıları ACTH reseptörü yerine LH reseptörü tarafından alınmasının farklı olması haricinde adrenal zona retikülarisdekine benzerlik göstermektedir ve diğer taraftan leyding hücreleri *3βHSD2* ve *17BHSD3* genlerini eksperese ederken, *SULT2A1* ekspere edemediği için sentezlenen DHEA, DHEAS dönüştürülememekte ve üretilen DHEA hızlı bir şekilde androstenedion ve daha sonra testosteron dönüştürülmektedir.

Overyan stereid biyosentezi daha karmaşık olup bunun nedeni teka ve granülosa hücreleri arasındaki enzimatik basamakları içermesinden kaynaklanmaktadır. Steroid biyosentezi aynı zamanda menstrüal döngü evrelerine görede farklanmaktadır. Folliküler fazda estradiol primer steroid iken progesteron lüteal fazda primer hormondur. Overyan steroid sentezinde granülosa hücreleri, *CYP17A1* geni eksperese olmamaktadır (171) dolayısı ile steroid sentezi granülosa hücrelerinde LH etkisi ile başlamakta ve cAMP ile P450scc (*CYP11A1*) (171) ekspresyonunu tetiklemektedir. Pregnenolon and progesteron, granülosa hücrelerinden bitişiğindeki *CYP17A1* ve *3βHSD2* ekspresyonuna sahip teka hücrelerine androstenedion sentezi için aktarılır. Üretilen androstenedion'nun küçük bir miktarı testosterona dönüştürülür fakat androstenedionun büyük bir kısmı FSH etkisi ile granülosa hücrelerine östron ve östradiol sentezi için geri gönderilir (Şekil 2.5). Özetle, FSH granülasa hücrelerini teka hücrelerinde üretilen androjenlerini aromatize etmek için uyarmadan önce LH teka hücrelerini androjen üretmeleri için uyarmaktadır. Ovulasyondan yaklaşık 2 hafta önce (folliküler faz), LH teka hücrelerinde LH reseptör, *StAR, P450scc, 3βHSD2* ve *P450c17* genlerinin ekspresyonunu arttırırken, FSH, granula hücreleri tarafından sentezlenen *17BHSD1* ve aromataz (*CYP19*) ekspresyonunu arttırmaktadır.



Şekil 2.5. Gonadal Steroid Biyosentez Yolağı. *Yolakta Yer Alan Anahtar Enzimler ve Enzim Kofaktörleri Ok İşareti İle Gösterilmiştir.*

Kaynak: Miller and Auchus, 2011:32 (1).

IGF (İnsülin benzeri büyüme faktörü), *TGF* (transforming büyüme faktörü) ve *EGF* (epidermal büyüme faktör) aileleri gibi intra-overyan peptitler, follikogenez ve steroid biyosentezini etkilemektedir. GDF9 (germ hücre farklışma faktörü-9), follikogenez süresince oosit tarafından eksprese edilmekte ve granülosa hücre farklılaşmasını desteklemekte, teka hücrelerini uyarmakta ve luteal hücre oluşumunu inhibe etmektedir (172). *IGF*, FSH ya olan cevabı arttırmaktadır. IGF-1 ve *IGF-2* granülosa hücre farklılaşması ve östradiol salınımı arttırabilmektedir fakat sadece *IGF-2* mRNA'sı over de özellikle granülasa hücrelerinde eksprese olmaktadır (173). *IGF-1* eksikliği olan kadın hastalarda yumurtlama, gonatropinler tarafından uyarılabilmektedir ki (174) bu durum IGF-1 in follikogenez için gerekli olmadığı yönündeki görüş ile uyumludur. Granülosa hücreleri aynı zamanda iki ayrı formda olan ve sadece β alt birimi ile birbirinden farklanan α ve β heterodimer inhibin üretmektedir. A ve B inhibinin serum konsantrasyonu menstrüal döngüye göre farklılanmakla birlikte artan folliküler büyüklük ile inhibin A folliküler sıvıda artarken ovulasyondan hemen önce artma başlamakta ve luteal fazda en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. İnhibin B ise FSH tarafından granülosa hücrelerinin uyarılması ile miktarında artma gözlenir (175). İnhibin

B, erken folliküler fazda maksimum seviyeye ulaşarak pituriteriden salınan FSH'yı geç folliküler fazda inhibe eder. Teka interna, interstitial hücrelere farklılaşmaya devam eder ve bu esanada daha fazla androstenedion üretir. Granülosa hücre katmanları birbirinden farklı katmanlara farklılaşırlar. Membran katmanı FSH ya cevap olarak LH reseptörü eksprese ederken, kumulus katmanı sürekli olarak LH reseptörü eksprese eder. Yumurtlama için baskın olan bir follikül seçilir ve ovulasyon için olgun graafian foliküle dönüşür. Ovulasyonu takiben LH granülosa hücrelerini granülosa lutein hücrelerine farklılaşması için indükler ve kalan teka insterstial hücreleri teka lutein hücrelerine dönüştürülerek korpus luteum hücrelerini oluşturur. LH aynı zamanda granülosa lutein hücrelerini, VEGF (vasküler endoteliyal büyüme faktörü) eksprese etmesi için uyarır. VEGF, tabandaki mebrana nüfuz ederek steroid biyosentezi için gerekli olan LDL temin edecek olan korpus luteumun damarlanmasını sağlar. Ovülasyonu takiben lüteal hücreler bazal LH seviyesini korpus luteumda sabit tutabilmek için daha fazla LH reseptörü eksprese eder. Hamileliğin birinci trimester döneminde insan koryon gonatropin, LH resptörlerini korpus luteum tarafından salınan progesteron sentezi indüklemek için uyarır. Yumurtlama öncesi folikülere zıt olarak, granülosa lutein hücreleri ve gebelikteki korpus luteum yüksek oranda P450scc ve 3βHSD genlerini progesteron senetezini mümkün kılmak için eksperese eder.

2.6.3. Beyinde Steroid Biyosentezi (Nörosteroid)

Merkezi sinir sisteminin (CNS) gelişimi ve fonksiyonunda steroid hormonların hayati öneme sahip olduğu kesin olarak kabul edilmiştir (176-190). Kimyasal yapı ve plazma konsantrasyonlarına bağlı olarak steroid hormonlar nöral dokular üzerine olumlu ya da olumsuz etki gösterebilir (191-209). Uzun süre görüş, steroid hormonların sadece steroidojenik endokrin bezler tarafından sentezlendiği ve burada üretilen hormonların beyin tarafından kullanıldığına dairdi fakat Baulieu ve Robel'in farklı bir bakış acısı kazandıran gözlemleri bu bilginin doğru olmadığı yönünde olmuştur. Baulieu ve Robel tarafından yapılan ilk gözlem D5P (pregnenolon), DHEA ve bunların sülfat esterleri olan D5PS (D5P-sülfat) ve DHEAS konsantrasyonların plazmaya oranla beyinde daha yüksek olmasıdır (210-212). İkinci olarak belirlenen bu hormon seviyelerinin adrenolektomi ve kastrasyona rağmen uzun süre yüksek seviyesini koruyabilmesi (211-213) ve üçüncü olarak dolaşımda yer alan steroidler de görülen sirkadiyan varyasyon ile beyin steroid konsantrasyonunda görülen değişimin birbiri ile uyumlu olmamasıdır

(214). Bu gözlemler, beyinde biyolojik aktif olan steroid sentezinin kendisi tarafından yapıldığı olmuştur ve **nörosteroid** terimi beyinde sentezlenen aktif steroid hormonları tanımlamak için kullanılmıştır (215-218). Nörosteroidojenez lehine yapılan görüş daha sonra steroid sentezinde yer alan enzim ekspresyonlarının nöron ve glial hücrelerinde belirlenmesi (215, 216, 219-229) ve belirlenen enzimlerin beyin dokusunda fonksiyonel olduğu ve substratı ürüne dönüştürdüğü saptanmıştır (210, 219, 221-223, 229-242). Yapılan bu çalışmalar ışığında, nörosteroidlerin beyinde geniş çapta biyolojik aktivitelere sahip olduğu (198, 243-246) ve bu etkiyi genom üzerine direkt ya da membran reseptörleri aracılığı ile göstermektedir. Özellikle, nörosteroidlerin; $GABA_A$/sental-tip benzodiazepin allosterik reseptör kompleksi (243, 244, 247-249) NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptör (250-255), KAR (kainat reseptör) (256, 257), AMPA (α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit) reseptör (257-259), sigma reseptör (260-266), glisin reseptör (267-272), serotonin reseptör (273-275), nikotinik reseptör (276-280) ve muskarinik reseptörlerinin (281-283) allosterik modülatörü olarak görev yaptığıdır.

Son zamanlarda kabul edilen diğer bir bulgu nörosteroidler, GPCR (G proteine bağlı (coupled) membran reseptörünü)'ye direkt olarak aktifleştirerek (284-295) veya dolaylı olarak nöropeptitlerin kendi reseptörlerine bağlanmaları üzerine etki ederek fonskiyon gösterdiğidir (296-300). Nörosteroidlerin aynı zamanda MAP2 (mikrotübül-ilişkili protein 2)'ye bağlanarak tübülin polimerizasyonunu uyardığı kültüre alınmış nöronlar üzerinde gösterilmiştir (301-304). Yapılan *in vitro* çalışmalar, nörosteroidlerin uyarılma, farkındalık, stress, depresyon, uyku, endişe, cinsellik ve beslenme ilişkili durumlar gibi farklı nörofizyolojik ve davranışsal olayların belirlenmesinde rol oynadığıdır (217, 244, 246, 257, 305-324). Nörosteroidlerin bilinen bütün bu etkilerine rağmen, bunların beyinde nasıl sentezlendiği ve bu sentezin nöral düzenlenme mekanizmaları hakkında sınırlı bilgi mevcut olup, son zamanlarda çoğunlukla amfibiler ve kuşlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu nörosteroid sentezinin nörotransmiter ve nöropeptitler tarafından dikkatli bir şekilde düzenlendiği bilinmektedir. Vertabra beyninde steroid biyosentezinde yer alan kilit enzimlerin varlığının immunohistokimyasal ve *in situ* hibridizasyona dayalı yöntemlerle keşfedilmiştir. Bu enzimler arasında StAR, P450scc, 3βHSD, P450c17, 17BHSD, 5a-R (5a-redüktaz), 3a-HSD, sitokrom P450a (P4507a), CYP19A1 (sitokrom 450aromataz, P450arom) ve HST (hidroksisteroid sülfataz) yer almaktadır. Belirlenen enzimlerin birçoğu beyinde *de novo* olarak steroid biysentezi

yapabilmekte bunu yaparken steroid biyosentezinin öncü molekülü olan kolestrolü kullanabilmesi bu enzimlerin gerçek steroidojenik enzimlerin olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan P450arom ve 5a-R enzimleri primer olarak periferal endokrin bezlerde üretilen steroid hormonların beyinde sağlanan dönüşümünden sorumludur.

StAR mRNA insan beyninde, frontal lob, hipokampus, temporal korteks, pons ve serebellumda belirlenmiştir (325). Aynı zamanda artan StAR mRNA ekspresyonu oligodendroglioma ve malign glial tümörlerde, özellikle glioblastom-multiforma gibi oldukça malign olan bir astrositomin formunda bulunması, StAR'ın insan gliom tümör oluşumunda rolü olabileceği kanısının oluşmasına neden olmuştur (326). Glioma oluşumunda kolestrolün gerekliliği (327) ve artan StAR ekspresyonunun astrositomalardaki tümör gelişimini ile ilişkili olabileceğini desteklemektedir (326).

P450scc mRNA insan beyninde olfaktör bulbus, korpus kallosum, kaudat nükleus, talamus, amigdala, hipokampus, serebral korteks ve serebellumda belirlenmistir (325, 328-331). P40scc'ye ait proteinler aynı zamanda insan CNS belirlenmiştir (332).

İnsanlarda 3βHSD'nin iki izoformu mevcut olup, tip II (3βHSD2)'ye ait mRNA ekspresyonu RT-PCR ile amigdala, korpus kallosum, kaudat nükleus, hipokampus, talamus, serebellum ve spinal kordda belirlenmiştir (169).

P450c17 aktivitesi memeli pituriteri (333) ve amfibilerde bulunmuştur (232). 17-HSD izoenzimleri (tip 1-4)'ne ait mRNA'lar insan beyinde, temporal lob, serebral korteks, hipokampus ve subkortikal beyaz madde de belirlenmiştir (334-338). 5α-redüktaz enzimine ait iki farklı izoform iki farklı gen tarafından kodlanmakta olup ekspresyonları insanda belirlenmiştir (339-342). Her iki izoformda aynı fonksiyona sahip olmalarına rağmen, farklı en uygun pH değeri, substrat seçiciliğinin olması farklı fonksiyonel özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (343-345). 5α-R'a ait yapılan çalışmalar tip 1 izoformunun tip 2'ye oranla daha yüksek oranda insan beyninde bulunduğunu göstermektedir (336, 342, 346-350). İnsan beyninde, 5α-R tip I mRNA temporal korteks, subkortikal beyaz madde ve kronik temporak epilepsi hastalarından alınan hipokampal dokularında (351, 352) ve aynı zamanda serebellum, hipotalamus ve ölüm sonrası alınan ponlarda belirlenmiştir (349). 3α-HSD tip 2 ve tip 3 mRNA'ları insan CNS yüksek oranda eksprese olmaktadır. Özellikle, tip 2 mRNA frontotemporal lob, putamen, medulla ve spinal kord (353) ve aynı zamanda subkortikal beyaz maddede

belirlenmiştir (336). Buna rağmen tip 3 mRNA çoğunlukla putamen, serebellum, medulla ve spinal kordda eksprese olmaktadır (353).

2.6.4. Alternatif Yolaklar

Androjen biyosentez ve virilizasyon üzerine kanguru (*tammar wallby*) kullanılarak yapılan çalışmalar, yeni alternatif bir yolağın varlığını ortaya koymuştur. Bu yolakta 17OHP'dan DHT dönüşümü direkt olarak sağlanmakta ara basamaklar olan DHEA, androstenedion veya testosterona gereksinim duymamaktadır (354, 355).

Steroidojenik hücrelerde 5α-redüktaz varlığı, C19 steroid (testosteron, androstenedion, DHT) sentezini engellemez, aksine DHT sentezi için gerekli olan öncü maddeleri indirgeyerek DHT üretimini arttırır. İnsan P450c17 enziminin, 17OHP için zayıf olan 17,20 liyaz aktivitesine rağmen P450c17 enzimini 17,20 liyaz aktivitesi için substrat olarak 17OHAllo (17α-hydroxylated allopregnanolone)'yu kullanarak alternatif yolak, 17OHP'den C19 steroidlerin üretimini mümkün kılar. Alternatif yolağın aktif olabilmesi için 5α-R aktivitesinin varlığı kilit rol oynamaktadır. Bu yolağın varlığı ilk olarak keseli hayvanlarda belirlenmesine rağmen, insan steroid biyosentezi içinde olası görünmektedir. İnsan steroidojenik dokularda 5α-redüktaz aktivitesinin en iyi araştırıldığı durum korpus luteumda 5α-redüktaz tip 1 enzimi tarafından 5α-dihidoprogesteron (5α-DHP) üretimidir (1). İnsan enzimleri bu reaksiyonu DHT üretimine kadar taşımak için gerekli olan bütün enzimleri sentezlemektedir ve buna dair en iyi örnek fetal adrenal tarafından 5a-R ile indirgenmiş androjenlerin üretimidir. Sonuç olarak, alternatif yolağın 21OH ya da POR (P450 oksidoredüktaz) eksikliği gibi 170HP birikimi ile sonuçlanan patalojik durumlarda, DHT üretimi için majör yolak olarak ortaya çıkmaktadır. Alternatif yolak için gerekli olan bütün ara ürünlerin bebek, çocuklar, POR eksikliği olan yetişkin, POR eksikliğine sahip fetüs taşıyan kadınlar da ve hafif POR eksikliğine sahip yetişkinlerde varlığı kütle spektrofotometri ile yapılan üriner steroid analizlerinde belirlenmiştir(3, 356-358). Alternatif yolağın varlığı 21OH ve 11OH eksikliğine sahip bebeklerin ağır derece virilizasyon göstermesine rağmen, 3βHSD2 eksikliğne sahip olan 17OHP sentezleyemeyen bireylerde neden minimal düzeyde virilizasyonun ortaya çıktığını açıklayabilir (359). Alternatif ve genel olarak kabul edilen yolağın (conventional pathway), hamileliğin 8-12 haftalarında insan cinsiyet gelişimi esnasında DHT üretimine olan katkısı ve 5α-R'nin fetal adrenal ve gonadlarda ki ekspreseyonlarına dair veriler üzerine çalışılmaktadır (360).

2.7. Cinsiyet Hormonları

Cinsiyet hormonları çeşitli biyolojik olayların fizyolojij ve patolojilerinde görev almaktadır (361, 362). Cinsiyet hormonlarından olan östrojen ve androjenler biyolojik fonksiyonlarını nükleer resöptörleri olan östrojen reseptör (ER) ve androjen reseptör (AR) aracılığı ile gerçekleştirir. İki farklı östrojen reseptörü olan ERα ve ERβ sırası ile *ESR 1* ve *ESR2* genleri tarafından kodlanır ve farklı dokularda ekspresyon desenine sahiptir.

ERα meme, karaciğer, kemik, beyin, ürogential ve kardiyovasküler sistem de buna karşılık ERβ meme, kemik, akciğer, beyin ve ürogenital, gastrointestiniyal ve kardiyovasküler sistemlerde eksprese olur (363). Östrojen, ERα ya da ERβ'yi aktive edebilir ya da reseptörlerden herhangi birine spesifik olarak bağlanabilir. Ligand, östrojene bağlandığında östrojen reseptörü, dimer (hetero ve/veya homo) oluşumu (ERα: ERα:, ERα:Erβ, ERβ: ERβ) ile östrojene duyarlı olan genlerin eskpresyonu değiştirir. Ligand ile aktive olan reseptör, gen promotör bölgesinde yer alan österojen respons elemente bağlanır ve komodulatörleri aktive ederek bu genlerin transkripsiyonunu etkiler/değiştirir (364).

AR, nöroendokrin, kas-iskelet dokuları ve erkek ürogenital sisteminde eksprese olur (365). AR'nin aynı zamanda gential ve genital olmayan bölgeler de saç foliküllerinde dermal papilla hücrelerinde eksprese edildiği belirlenmiştir (366). AR, österojen reseptörüne benzer bir mekanizma ile ligand bağlanması ile aktive olur ve AR homodimer oluştururarak androjene duyarlı genlerin promotör bölgesindeki ARE (androjen respons elementler) bağlanır ve gerekli komodülatörleri aktive ederek gen ekspresyonlarını etkiler.

Farklı androjenler farklı AR bağlanma kapasitelerine sahiptir. DHT, AR'ye en yüksek affiniteyi gösterirken bunu sırası ile testosteron, DHEA ve androstenedion izler. DHEA ve androstenedion AR bağlanma kapasitelerinin düşük olması nedeni ile zayıf androjen olarak adlandırılırlar (367). Son zamanlarda yapılan çalışmalar aynı zamanda DHEA'nın yalnızca AR'a değil aynı zamanda, ER bağlandığını ve ERα ya oranla ERβ'ye daha yüksek oranda bağlanma kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (368).

Steroid hormon reseptörlerin sadece nüklear translokasyon ve spesifik respons elementlere bağlanarak transkripsiyonel düzenlemeler yaptığı ve sonuç olarak genlerin eksperesyonlarını etkilediği bilinmektedir. Aynı zamanda yapılan çalışmalar bunun

haricinde steroid hormon reseptörlerinin yeni ve transkripsiyonel etkisinin yanında genom üzerine doğrudan etki yapmadan, farklı etkisinin olduğu da belirlenmiş. Bu şekilde etkisine non-genomik etki olarak adlandırılmaktadır. Bu etki, gen transkripsiyon ve protein sentezinden ziyade steroid(ler) tarafından, sitoplazmik veya hücre membranına bağlı düzenleyici proteinlerin (cell membrane bound regulatory protein) düzenlenmesini kapsamaktadır. Steroid hormonların bu etkisi RNA ve protein sentezini etkileyemecek kadar kısa süre içerisinde gerçekleşmesi ve hücre membranında lokalize olmuş steroid hormon reseptör parçalarının bulunması (364, 369, 370) steroid hormonların nükleer olmayan etkisinin keşfedilmesine temel oluşturmuştur. Steroid hormonların bu fonksiyonunu tanımlamak için non-genomik, non-nükleer ya da non-transkripsiyonel gibi farklı terimler kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu olgunun nasıl gerçekleştiğine ve moleküler mekanizmaların detaylarına ait bilgilerin olmayışı sınıflandırma ve terminolojinin değişken olmasına da neden olmaktadır (371).

Cinsiyet hormon sinyal iletimi meme ve prostat kanser oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Meme kanserinin birçok tipi ER pozitif olarak sınıflandırılır ve kanser hücrelerinin çoğalması östrojen varlığına bağlıdır (372). Androjenik substratın östrojene dönüşümü aromataz (CYP19A1, P450aro) tarafından gerçekleştirilmekte olup, dokuya özel olarak aromataz genin ekspresyonu farklı promotörler tarafından kontrol edilir (373, 374). Androjen sinyal yolağı prostat gelişimi gibi normal fizyolojik olaylarlar da önemli role sahip olduğu gibi prostat kanserinin birçok tipi androjene bağlı olup kanser hücrelerinin çoğalması andojen varlığına gereksinim duyar (375).

AR geni üzerinde meydana gelen ve kısmı ya da tam inaktivasyona neden olan mutasyonlar X-bağlı resesif olarak kalıtılan bir hastalık olan androjen insensitivite sendromuna neden olmakta ve tam AR inkativasyon mutasyonuna sahip erkekler normal 46,XY karyotipine sahip olmalarına rağmen kör vajina, dişi eksternal genitalyaya sahiptir ve meme gelişimi gösterir buna karşılık uterus ve uterus ilişkili organ veya kısımlar ya da abdominal/inguinal testise sahip değildir. Kısmi AR kaybına sahip olan erkeklerde ise hipospadias, mikropenis ve jinekomasti klinik bulguları olur (376).

SBMA (Spinal–bulbar kas atrofi), X-bağlı resesif olarak kalıtılan bir hastalık olup, *AR* geninde birinci ekzonunda yer alan artan CAG tekrarı (üçlü tekrar artışı) kaynaklı olarak meydana gelmektedir. CAG tekrar bölgesi AR protein üzerinde PoliQ (poliglutamin)

kısmını sentezlemektedir ve artan glutamin miktarı sentezlenen proteinin yeni bir fonksiyon kazanımına ve sahip olunan yeni fonksiyon, etkilenen bireylerde motor nöron dejenerasyonuna neden olmaktadır. Tekrar sayısının fazla olması semptoların daha erken ortaya çıkmasına ve daha ağır bir klinik sergilenmesine neden olur (377).

2.8. Steroid Biyosentez Enzimleri

Steroid biyosentezinde yer alan enzimleri çoğunlukla sitokrom P450(CYP) veya HSD ailelerinin üyeleridir. Bu steroid enzimlerin katalizlediği rekasiyonlar tek yönlü olup, meydana gelen ürünün tekrar öncü maddesine dönüşümü mümkün değildir. Bütün P450 tarafından katalizlenen hidroksilasyon ve karbon-karbon bağının kırılması reaksiyonları mekanik ve fizyolojik olarak geri dönüşümsüzdür (378).

HSD tarafından katalizlelen reaksiyonlar mekanik olarak geri dönüşümlü olup, sabit koşullar altında *in vitro* olarak bu reaksiyonlar çift yönlü meydana gelebilmektedir, fakat *in vitro* olarak herbir HSD steroidleri dominant olarak oksidatif ya da indirgeyici durumda olma reaksiyonlarını katalizlemektedir (379). Diğer taraftan iki veya daha fazla HSD enzimleri hidroksisteroid ve onların soydaş ketosteroidlerini zıt yönlerdeki reaksiyonlarını katalizleyebilirler yani bazı HSD'ler ketosteroidleri indirgenme reaksiyonlarına tabi tutarken, diğerleri hidroksiteroidlerin oksidasyonunu katalizleyebilir. HSD bir kaç farklı izoform halinde mevcut olup (380) steroid sülfotransferaz, redüktaz ve steroid sülfataz gibi enzimler ile iş birliği içeresinde olup bütün hedef dokularda biyolojik olarak aktif olan hormon seviyelerinin düzenlenmesinde görev alır.

2.8.1. Sitokrom P450

Sitokrom P450 terimi bir grup oksidatif enzimi tanımlamak için kullanılmakta olup, bu grup enzimin tamamı yaklaşık 500 amino asitten oluşmakta ve tek hem grubu ihtiva etmektedir (381). Bu grup enzimin pigment 450 (P450) olarak tanımlanmasının nedeni, bu gruba ait bütün enzimlerin indirgenmiş formlarının ışığı 450nm absorbe etmesinden kaynaklanır. İnsan genomu yaklaşık 57 adet sitokrom P450 enzimi ihtiva etmekte olup (10, 15) bunların 7 tanesi mitokondriyaldir ve Tip I olarak adlandırılır, geriye kalan 50 adet P450 enzimi endoplazmik retikulumda fonksiyon gösterir ve Tip II olarak adlandırılır. Bütün P450 enzimleri hem grubunu kullanarak moleküler oksijeni aktive eder ve bunun için NADPH'ın indirgenmiş formunun elektronunu kullanır. NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat)'den elektronu alma şekilleri ve hücrelerarası

lokalizasyonlarında (mitokondriyal-ER (mikrozomal)) farklılıklara neden olan biyokimyasal yapılarına göre P450 enzimleri iki gruba ayrılır, Tip I enzimleri elektronlarını NADPH'den flavoprotein olan FdR (ferrodoksin redüktaz) ve küçük demir-sülfür proteini olan Fdx (ferrodoksin) aracılığı ile alırken, Tip II enzimleri NADPH'den gelen elektronu 2-flavin protein olan POR enzimini kullanarak alır (382).

P450 enzimin herbiri birden fazla substratı metabolize ve geniş çaplı oksidasyon reaksiyonlarını kataliz edebilir. 6 adet P450 enzimi steroid biyosentezinde görev almaktadır. Bunlar CYP11A1, CYP11B2, CYP11B1, CYP17A1 ve CYP19A1'dır. CYP17A1, CYP21A2 ve CYP19A1 dâhil olmak üzere bütün mikrozomal Tip II sitokrom P450 enzimleri gerekli olan elektronu membran-bağlı flavoprotein olan ve mitokontrial flavoproteinden olan ferrodoksin redüktazdan farklılık gösteren POR protein aracılığı ile alırlar (382). *POR*, insan dokularında eksprese edilen ve beyin ve böbrek gibi farklı dokularda dahi fonksiyon gösteren bütün mikrozomal P450 enzimleri için yegâne elektron transfer proteini olarak yapmaktadır. POR elektron kaynağı olarak NADPH kullanılır ve her defasında bir elektronu P450'ye transfer ederek fonksiyon gösterir (383, 384).

Elektron alıcısı olan P450'de yer alan redoks-partner bağlanma yüzeyi, POR'dan temin edilecek olan elektron için önemli bir konuma sahiptir (382, 385). *CYP17A1* geninde, redoks-partner bağlanma bölgesinde meydana gelen mutasyonun, 17,20-liyaz eksikliğine neden olması ile bu durum kanıtlanmıştır (386, 387). POR geni, 69 kb büyüklüğünde olup, kromozom 7 üzerinde (7q11.2) lokalize 16 ekzondan meydana gelmektedir. Dört farklı etnik gruba ait normal popülasyon da ve 842 bireyde yapılan dizi analizi *POR* geninin oldukça polimorfik olduğunu ve protein kodlayan bölgede belirlenen p.A503V varyantının yaklaşık olarak bütün allellerin %28 de mevcut olduğu belirlenmiştir. Bu allel, CYP17A1 enziminin 17-hidroksilaz ve 17,20-liyaz aktivitesini normal proteine göre %60 azalttığı (304. 305), buna rağmen P450c21 aktivitesi üzerine hiç bir negatif ya da pozitif (aktivite artışı) etkiye neden olmadığı belirlenmiştir (388).

NADPH tarafından temin edilen elektron bir flavoprotein olan ve mitokondrinin iç zarı ile ilişkili ferrodoksin redüktaz (adrenodoksin redüktaz) tarafından kabul edilir. Ferrodoksin redüktaz aldığı elektronu demir-sülfür protein olan ve mitokontriyal matriks veya IMM'ye zayıfça bağlanan ferrodoksine (adrenodoksin) transfer eder.

Ferrodoksin de bu elektronu bütün mitokondriyel P450 enzimlerine transfer ederek, elektron transfer proteini olarak fonksiyon gösterir.

İnsan FdR (389, 390) ve Fdx (391) genlerinin bütün dokularda eksprese olması bu proteinlerin P450 enzimlerine elektron transfer fonksiyonundan daha farklı fonksiyonlara sahip olabileceği görüşünün kabul görmesine neden olmaktadır (392, 393).

2.8.2. Hidroksisteroid Dehidrogenaz

HSD grubu enzimlerin moleküler ağırlığı yaklaşık 35-45 Kda olup, hem grubu ihtiva etmezler ve kofaktör olarak iki elektronu NADH veya NADHP'den alıp hibrid transfer mekanizması ile steroidlerin indirgeme ya da yükseltgenme (oksidasyon) reaksiyonları için kullanırlar (379).

P450 enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonların çoğunluğu tek bir P450 enzimi tarafından katalizlerinken, HSD tarafından katalizlenen herbir reaksiyon en az iki ve genellikle farklı izoenzimler tarafından katalizlenebilir. Steroid biyosentezinde görev alan HSD enzimleri; 3α-HSD, 3β-HSD, iki tane 11β-HSD ve farklı izoenzimleri ihtiva eden 17β-HSD'leri ihtiva etmektedir.

HSD enzimleri yapılarına göre iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar SDR (kısa-zincir dehidrogenaz/redüktaz) ve AKR (aldo-keto redüktaz) aileleridir (379, 380). SDR indirgenme/yükseltgenme reaksiyonları için nikotinamini kofaktör olarak kullanır. AKR ise aktif bölgede steroidden ya da steroidlere yapılan proton transferinin katalizlenmesinde görev alan tirozin ve lizin amino asit rezidülerini ihtiva eder. SDR enzimleri 11β-HSD 1 ve 2, 17β-HSD'nin tip I, II ve III izoenziminlerini ihtiva ederken, *AKR* enzimleri *17β-HSD5*'i ihtiva etmektedir.

HSD enzimlerini fizyolojik aktivitelerine göre sınıflandırmak daha yararlı olmakla birlikte, HSD'ler genellikle dehidrogenaz ya da redüktaz aktivitelerine sahiptir. Dehidrogenazlar, NAD^+, ko-faktör olarak kullanarak hidroksisteroidleri ketosteroidlere yükseltgerken (oksidation), redükdazlar, NADPH'yi ko-faktör olarak kullanarak ketosteroidleri hidroksisteroidlere indirgenmesini katalizler. *İn vitro* olarak ortamın pH'sı ve ko-faktör konsantrasyonuna bağlı olarak, HSD enzimlerinin çift yönlü olarak fonksiyon göstermesine rağmen intakt hücrelerde genellikle tek yönlü olarak fonksiyon

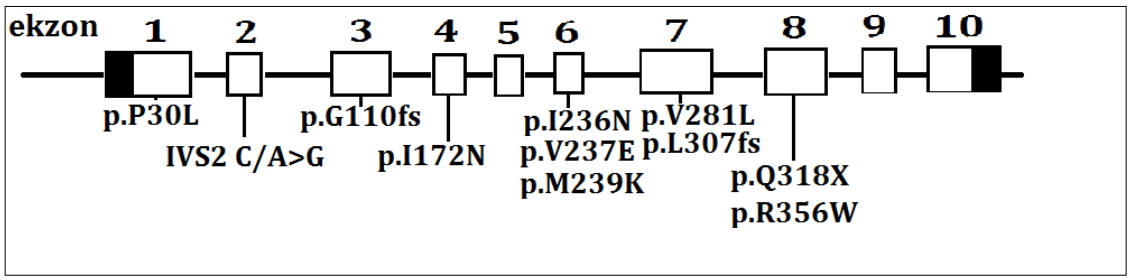
göstermektedirler ve reaksiyonun yönü ortamda bulunan ulaşılabilir ko-faktör konsantrasyonu tarafından belirlenmektedir (379, 380).

Enzimlerin hangi yönde aktivite gösterecekleri ortamda bulunan indirgenmiş ya da yükseltgenmiş ko-faktörlerin varlığına enzimlerin NAD(H) veya NADP(H)'a olan bağlanma eğilimlerine bağlıdır çünkü ortamda bulunan ko-faktör konsantrasyonu steroid konsantrasyonundan birkaç kat fazla olabilir (379, 394). Sonuç olarak ortamda bulunan NADPH konsantrasyonun azaltarak veya bu enzimler üzerinde meydana gelen ve NADPH bağlanma yeteneğini olumsuz etkileyen mutasyonlar ile redüktif enzimler azaltılabilir ya da reaksiyon yönü tersine çevrilebilir (395, 396).

2.9. CYP21A2

2.9.1. CYP21A2 Gen ve Özellikleri

CYP21 genlerinin genom içerisinde bulunduğu bölge genomda en karmaşık bölgeler içerisinde yer almaktadır ve bu durum 21-hidroksilaz eksikliğinin neden en yaygın otozomal resesif hastalıklar arasında yer aldığını açıklamaktadır. Genom içerisinde iki adet 21-hidroksilaz lokusu bulunmakta olup fonksiyonel olan gen *CYP21A2* ve fonksiyonel olmayan yalancı gen *CYP21A1P* olarak adlandırılmaktadır. Her iki gende 6. kromozom (6p21.1) üzerinde HLA lokusunun ortasında yer almaktadır (397, 398). *CYP21A1P* geni eksprese olmasına rağmen kodlanan mRNA protein kodlamamaktadır. *CYP21* genleri 10 ekzondan oluşmakta olup, yaklaşık 3.4 kb uzunluğundadır ve iki gen birbirinden sadece 87 ya da 88 baz ile farklılık gösterir (399-401) ve yalancı gen kaynaklı 11 farklı baz değişimi kaynaklı mutasyon bilinmektedir (Şekil 2.6) *CYP21* genlerinin bulunduğu HLA bölgesi yüksek rekombinasyona gitme eğilimine sahiptir ve dolayısı ile *CYP21A1P* ve *CYP21A2* arasında meydana gelen parça değişimi oldukça yaygındır. 21-hidroksilaz eksikliğine neden olan genetik anomalilerin yaklaşık %75-80 iki gen arasında meydan gelen mikro ve makro parça değişimleri sonucu meydana gelmekte ve bu durum yalancı gen üzerinde yer alan mutasyonların aktif gen üzerine taşınımına ve dolayısı ile aktif gen ekspresyonunun azalması ya da tamamen inhibe olmasına neden olmaktadır (402, 403).



Şekil 2.6. *CYP21A1P Kaynaklı Patolojik Değişimler ve Lokalize Oldukları Ekzonlar.*

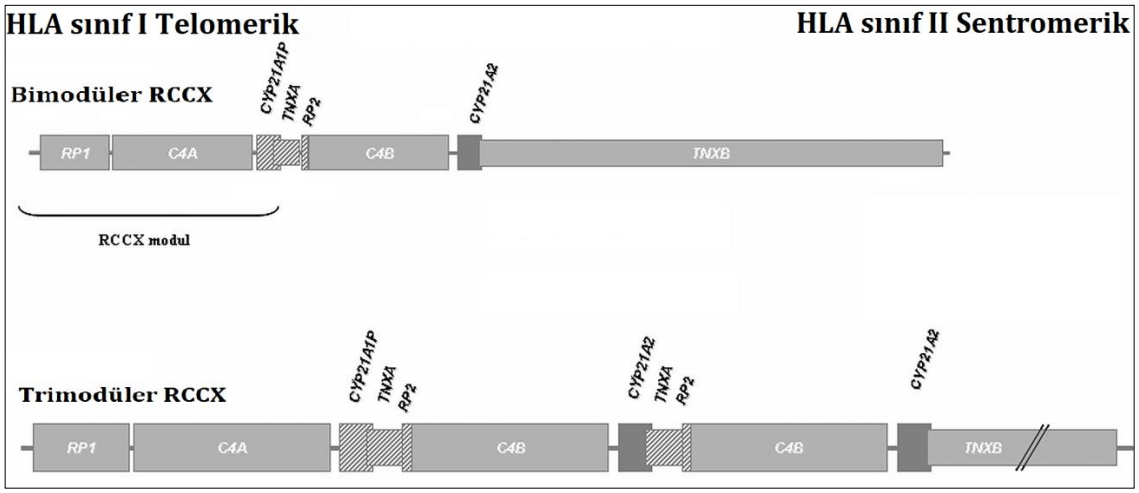
Kaynak: New et al., 2013:110 (404)'dan modifiye edilmiştir.

21-hidroksilaz genleri major histokompatibiliti kompleks sınıf III içerisinde yer alır ve HLA tiplendirmesi dolayısı ile *CYP21A2* gen mutasyonlarını belirlemede kullanılır. Tuz kaybına (SW) neden olan mutasyonlar, bazı popülasyonlar da HLA-B60 ve HLA-40 ile ilişkilidir (405) ve nadir olan diğer bir HLA tipi olan Bw47 yine aynı şekilde çok güçlü bir olasılıkla 21-hidroksilaz eksikliğinin tuz kaybettiren formu ile ilişkilidir (406). Bazı popülasyonlarda HLA-Bw51 basit virilizan tip ile ilişkilidir (407). HLA-B14 bulunan bireylerin yaklaşık %40'ı ise klasik olmayan KAH vakalarında belirlenmiştir (408) ve genellikle *C4B* gen duplikasyonu ile ilişkilidir (409, 410). Aynı HLA tipine aynı ailenin farklı bireyleri farklı klinik bulgu gösterebilirler (411-414) bu durum *de novo* mutasyonları veya birden fazla meydana gelen parça değişimleri sonucu meydana gelmiş olabilir.

Aynı lokus da 8 farklı gen daha yer almaktadır (415) (Şekil 2.7). Birbiri ardına duplike *C4B* ve *C4A* genleri C4 komplemet komponenetinin iki izoformunu kodlarlar ve birbirleri ile olan %99 sekans homolojisine rağmen C4B proteini büyük oranda daha fazla hemolitik aktiviteye sahiptir (416). C4A geni 22kb uzunluğunda fakat *C4B* geni sadece bir intronunda yer alan varyasyona bağlı olarak kısa (16kb) ve uzun (22kb) formlara sahiptir (417). C4 genlerini 3' ucu *CYP21* genlerinin transkripsiyon başlama bölgesinin sadece 2466 bp yukarısında yer almaktadır (418). Aktif olan *CYP21A2* geninin trankripsiyon için gerekli olan promotör bölgesi *C4B* geninin 35. intronunun içerisinde yer almaktadır (419).

TNXA (XA) ve *TNXB (XB)* olarak adlandırılan bir çift gen *C4* ve *CYP21* genleri arasında duplike olmuştur. C4 ve CYP21 genlerine zıt olarak DNA'nın negatif iplikciğinde yer alır. *CYP21A2* geninin 3' ucu ile çakışma gösterir, yani *XA* ve *XB* genlerinin son

ekzonu, *CYP21A2* ve *CYP21A1P* genlerini 10. ekzonunun 3' UTR bölgesi ile örtüşmektedir (420). XA yalancı gen olup atalardan kalma C4-CYP21-X genetik biriminin duplikasyonu esnasında kısalmıştır fakat adrenalde eksprese olur (421).



Şekil 2.7. *Kromozom 6q21 Bölgesinde Bulunan RCCX Modül ve Aynı Bölgede Görülen Kopya Sayısı Varyasyonları. RCCX (RP-C4-CYP21-TNX), RP1: serin/treonin kinaz 19 geni, RP2: serin/treonin kinaz 19 yalancı geni, C4A/B: komplement komponent C4A/B geni.*

Kaynak: Parajes et al. 2008:3 (422)'den modifiye edilmiştir.

XB, büyük hücreler arası matriks proteini kodlamakta ve bağ doku başta olmak üzere birçok dokuda eksprese olmaktadır (423, 424). XB geni yaklaşık 65kb uzunlukta olup, 43 ekzondan oluşmakta 12kb mRNA ihtiva etmektedir (423, 425). XB geni aynı zamanda daha kısa olan ve fonksiyonu bilinmeyen Tenaskin-X kodlamakta olup, bu formu XB geninde yer alan intragenik promotörden kaynaklanmaktadır (418). *CYP21A2* ve *XB* genlerinin delesyonunu kapsayan ardışık gen sendrom (contigous gene sydrome)'lu KAH hastalarını Ehlers-Danlos sendromuna (EDS) neden olan Tenaskin B eksikliği gösterir (426). EDS'nin birçok formu her ne kadar kollajen genlerinde meydana gelen otozomal dominant mutasyon kaynaklı olsa da resesif formları Tenaskin-X (kollajen fibrillerinin stabilizasyonunda sorumlu) gibi kollajen modifiye eden genlerde meydana gelen mutasyon kaynaklı olarakda açığa çıkmaktadır (427, 428). Tenaskin-X eksikliği, 21-hidroksilaz eksikliği ile birlikte ya da izole olarak farklı klinik ile EDS'nin daha ağır formuna neden olmaktadır (429).

2.9.2. CYP21A2 Eksikliği

CYP21A2 geninde meydana gelen mutasyon sonucu meydan gelen 21-hidroksilaz eksikliği, KAH'in en sık rastlanan formu olup yeni doğan metabolik hastalıkların birinci sıralarında yer almaktadır.

21-hidroksilaz eksikliği gen kayıpları, gen konversiyonları ve nokta mutasyonları sonucu meydana gelmektedir. En sık rastlanan nokta mutasyonlarının CYP21A2 geninin yalancı geni olan *CYP21A1P* ile arasında gerçekleşen küçük mikrokonversiyonlar sonucu meydana gelmesi (430-432) dolayısı ile gen konversiyonu 21-hidroksilaz eksikliğine neden olan mutasyonların yaklaşık %85'inin kaynağını oluşturmaktadır. 21-hidroksilaz eksikliği gösteren hastaların çoğunluğu taşıdığı mutasyon kompound hetezigot olup, her iki allelde de farklı mutasyon ihtiva eder. Homozigot gen kayıpları büyük parçaları kapsayan gen konversiyonlari, çerçeve kayması ya da prematür stop kodon oluşumu gibi genin ekspresyonunu elimine eden mutasyonlar genellikle 21-hidroksilaz eksikliğinin ağır klinik formu olan tuz-kaybına neden olur. Basit virilizan ya da klasik olmayan formları genellikle aminoasit değişimlerini kapsayan mutasyona sahiptir ki bu mutasyonlar mikrokonversiyonlar sonucu meydana gelebilir. Etkilenen hastalar genellikle bir allelde ağır diğer allelde ise hafif formda 21A2 gen ekspresini etkileyen farklı mutasyonları ihtiva ederler ve hastanın göstermiş olduğu klinik daha aktif olan yani sahip olduğu mutasyondan en az etkilenen allel tarafından belirlenir.

CYP21A2 gen lokusunun sıradışı özelliklere sahip olması bu genin analizini de zorlaştırmaktadır. Bu bölgede meydana gelen, *CYP21A1P* geni ortasında sabit olmayan kırılma noktasını ve *CYP21A2* genini kapsayan, nispeten sabit olan kırılma noktalarını kapsayan 30kb DNA kaybı oldukça nadir mutasyon tipi olup buna rağmen gen konversiyonları bu lokusda oldukca yaygındır (410, 433). Bu ikisi arasında en ayırt edici özellik gen konversiyonlarının DNA kaybına neden olmaması buna rağmen lokus üzerindeki değişkenliği (varyasyon) azaltmasıdır (434) ve genellikle büyük gen konversiyonları gen kayıpları, mikrokonversiyonlar ise nokta mutasyonları ile karıştırılabilir.

2.9.3 Patofizyolojisi

P450c21 aktivitesinin tamamının kaybı aldosteron eksikliğine neden olan progesteronun DOC (11-deoksikortizol)'a dönüşümünü bloke eder ve yeni doğanlarda tedavi

edilmeyen aldosteron eksikliği hiponatremi, hiperkalemi, asidosiz ve beraberinde gelen hipotansiyon, şok, kardiyovasküler kolaps ve ölüme neden olur. Adrenalde kan akışı merkeze doğru eğilimli (centripetal) olup adrenokortikal kapillerden gelen yüksek kortizollü akıntı medullayı temizler. Bu yüksek konsantrasyondaki kortizol, medüllada norepinefrini epinefrine çevirecek olan feniletanolamin N-metil transferaz transkripsiyonu için gereklidir (435) dolayısı ile KAH hastalarında düşük kortizol seviyesi düşük epinefrin konsantrasyonuna neden olmakta ve buda hipoglisemi riskini arttırmaktadır (436). Fetal adrenal ilk trimesterde kısa süreli kortizol sentezlemekte ve adrenal tarafından sentezlenen androjenin öncü maddelerini azaltmaktadır (437). KAH hastalarında düşük kortizol ACTH salınımını uyarmakta ve artan ACTH adrenal hiperplazi ve bütün steroidojenik enzimlerin transkripsiyonunun artmasına neden olmaktadır. Artan enzimatik aktivite 21-deoksisteroidlerin (progesteron vb) birikiminine ve bunların bazılarının androjene olan dönüşümünden dolayı etkilenen dişi fetuslarda virilizasyona neden olmaktadır, dolayısı ile virilizasyonun derecesi dâhil olunan *CYP21A2* mutasyonuna ve bu mutasyonun etkisine göre değişmektedir (438). Erkek fetuslarda üretilen testiküler testosteronun yüksek olmasından dolayı ilave olarak adrenalden üretilen androjen ilave belirlenebilen klinik bulguya neden olmamaktadır.

2.9.4. Klinik Bulguları

21OHD'nin farklı şekillerde klinik bulgu vermekte olup bunu tuz kaybı, basit virilizan ve klasik olmayan KAH şeklinde gruplandırmak mümkündür. *CYP21A2* geninde meydana gelen mutasyon çeşidinden farklı olarak, ekstra adrenal 21 hidroksilaz aktivitesinin varlığı, *CYP21A2* promotör polimorfizmi, androjen metabolizması ve androjenin kullanımı (reseptörüne olan bağlanma kapasitesi vb) bu vakalarda klinik farklılıkların oluşmasına neden olabilmektedir ve dolayısı ile genotip-fenotip arasında uyumsuzluk beklenebilmektedir.

21OHD'nin tuz kaybettiren formu enzimatik aktiviteyi %98'den daha fazla inaktive eden mutasyon kaynaklı olarak meydana gelmekle birlikte, glukokortikoid ve mineralokortikoid olmak üzere iki yolağı da inhibe etmektedir. Etkilenen dişi bebeklerde virilizasyon in utero dönemde meydana geldiği için (439) doğumda belirlenen eksternal genitalin maskulinizasyonundan dolayı hemen tanı konulabilmekte fakat tuz kaybı 5 günden önce belirlenememektedir. Eksik olan glukokortikoid ve mineralokortikoidler oral yolla verilerek ve ambiguis genitale plastik cerrahi yöntemleri

ile düzeltilebilir, fakat bu tedavi yöntemlerinin uygulanıp başarının sağlanması karışık ve zordur (440, 441). Etkilenen erkek bebekler tuz kaybı olduğunda 5-10 günlük iken ya da yeni doğan 17OHP taramalarında belirlenebilir bunun haricinde yeni doğan erkek bebeklerde genital bölgenin hiperpigment olması ve penisin normalden daha büyük ve buna oranla daha küçük testislere sahip olurlar (442).

Basit virilizan KAH (SV-KAH), virilize olmuş bayan ve klinik olarak karakterize edilemeyen erkek SV-KAH vakaları yüksek 17OHP seviyesi vardır fakat tuz kaybı görülmez. Bu hastalar enzimatik aktivitesini tam olarak elimine etmekten ziyade en az %2 enzimatik aktivite bırakan nokta mutasyonu (I172N vb) kaynaklı olabilir. Bu tip mutasyonlar tuz dengesinin sağlanması için gerekli olan aldosteron sentezine olanak sağlar. Adrenal aldosterondan, 100-1000 kat daha fazla kortizol sentezlemektedir, dolayısı ile *CYP21A2*'de meydana gelen hafif mutasyonun minerakortikoidden ziyade glukokortikoid eksikliğine neden olması daha olasıdır. Hafif olarak sekteye uğrayan aldosteron sentezi klinik olarak tuz kısıtlamasından sonra artan plazma renin aktivitesi ile belirlenebilir. Yeni doğan taraması olmayan durumlarda erkek hastalarda klinik bulgular genellikle 3-7 yaş arasına kadar gözlenmez. Bu yaşlarda meydana gelen pubik, aksiller, yüz kılları ve fallik büyümeler ortaya çıktığı dönemlerde aynı zamanda erkeklerin gelişimi normal yaşıtlarına göre daha hızlıdır ve epifizel olgunlaşma (kemik yaşı) buna oranla aynı hızlı ilerler ve yetişkinlikteki boyları daha kısa olur. Tuz kaybı ve basit virilizan formlarında hiperandrojenemi bulgularının minimuma indirilmesi için artan androjen seviyesinin tedavi ile normal sınırlar içerisinde tutulması gerekmektedir (442).

NKAH steroidojenik enzimlerden olan 21-hidroksilazın kısmi eksikliğine bağlı olarak gelişen, orta ile hafif hiperandrojenemi, hirsutizm, PKOS, oligomenore veya amenore, insülin direnci, erkek tipi kellik ve subfertiliteye neden olan kalıtsal bir hastalıktır. NKAH ile PKOS arasındaki benzerlik aşikâr olup, *CYP21A2* geninde meydana gelen değişikliklerin PKOS gelişimine olan katkısı ya da neden oluşuna dair NKAH ile PKOS arasındaki bağlantının çözümlenmesi ve bunun yanı sıra bu iki hastalığı birbirinden ayıran noktaların aydınlatılmasına dair çalışmalar devam etmektedir. Androjen fazlalığı kayda değer sayıda kadını (yaklaşık %10) etkilemektedir (443). Androjen fazlalığı semptomları hirsutizm, alopesi, akne, ovülasyon bozuklukları ve aşırı durumlarda virilizasyona neden olmaktadır. Androjen fazlalığına neden olan durumlar PKOS,

21OH, 11OH eksikliğine bağlı NKAH ve androjen salgılayan tümörlerdir. PKOS ve NKAH'ın birbirinden ayırt edilmesi klinik olarak zor olup, 21OH eksikliğine bağlı NKAH insanı etkileyen yaygın otozomal resesif hastalıklar arasında olup 1000-2000'de 1 görülme olasılığı var iken Güney Avrupa ülkelerinde görülme sıklığı %1, Aşkenaz Yahudilerin de ise bu durum %3-4'e kadar yükselmektedir (444, 445).

NKAH'a biyokimyasal olarak artan 17OHP ile tanı konulur ve bu durumun her ne kadar bazı genetik defektlerin kullanılan yöntemlerle analizi mümkün olmasada *CYP21A2* genotiplendirmesi ile konfirme edilmesi gerekir. NKAH'ın klinik bulguları arasında hirsutizm, alopesi, akne ve ovülasyon bozuklukları yer almaktadır. 21OH eksikliğinin derecesi her zaman klinik ile uyumlu olmayıp hatta bazı durumlarda asemptomatik olabilir (446).

PKOS az ovülasyon ve ayrıca anovülasyonun neden olduğu infertilite durumlarının en yaygın nedendir. Aynı zamanda kadınlarda rastlanan en yaygın endokrin bir hastalık olup hiperandrojenemi semptomları olan hirsutizm ve akne gibi klinikleri ihtiva etmesinin yanında obezite ve insülin direnci (IR) gibi metabolik hastalıklarda eşlik edebilir. PKOS yaklaşık olarak üreme çağındaki kadınların %7'sini etkilemektedir (447).

PKOS'un NKAH'a benzeyen yönleri NKAH hastalarının da hirsutizm gibi hiperandrojenemi bulgularının yanı sıra ovülasyon bozukluklarına işaret olan menstrual düzensizlikleri vardır. Buna ilave olarak PKOS aynı zamanda IR, hiperinsülemi ve polikistik over mofrolojisi sergiler (443). PKOS patogenezi, genetik ve çevresel olan birçok faktörü kapsayabilir. Ailesel yatkınlığın olduğu bilinmekte ve bu durum kompleks genetik özellikler ile kalıtılma ihtimalini güçlendirmektedir (447-451). PKOS patojenezinde rol alan ve kalıtılan genler, steroid hormon üretimi, androjen metabolizması, follikogenez, insülin direnci, insülin fonksiyonu, obesite gelişimi, gonadotrofinleri düzenleyen genler olabileceği gibi faklı mekanizmalarda rol alan genler ya da androjen reseptörü olabilir. Birçok çalışma aynı zamanda adrenokortikal steroid üretiminde rol alan genlerin PKOS patojenezinde rol alabileceği yönündedir. Bu 21OH, 11OH eksikliğine bağlı olarak artan adrenal androjen veya adrenal androjen üretiminde *CYP17A1*'in direkt olan aktivasyonuna bağlı olarak meydana gelebilir.

NKAH kısmı 21OH ya da 11OH eksikliği kaynaklı olup, klasik tiplerin gösterdiği ağır klinikleri sergilemez. Etkilenen kız çocuklarında erken püberte (PP) ve akne ile kendini

gösterebilir. Diğer taraftan yapılan çalışma PP şikayeti olan kız çocuklarının sadece %4-7'sinde NKAH tanısı almıştır (452). Bazı kaynaklarda farklı etnik gruplarda bu oran %30'a kadar yükselebilir. Daha sonraki yıllarda yetişkin kadınlarda hirsutizm, oligomenore veya amenore, alopesi ve subfertilite gözlenebilir. Bu kliniklerin ortaya çıkmasında oldukça fazla bireysel farklılıklar mevcut olup, bazılarında hirsutizm veya oligomenore olmaz iken rastlantısal olarak tanı alabilirler bu formu kriptik KAH olarak bilinmektedir (453). Bireysel genetik ve çevresel faktörlerin farklı fenotiplerin gelişmesine neden olma ihtimali yüksektir. Bu genetik varyasyonlar androjen sentezi, salınımı, metabolizması ve/veya androjen hormonlarına olan duyarlılığı arttıracak mekanizmalar üzerinde yer alabilir. Herbir bireydeki perifer dokularda 5α-redüktaz ifadesinin artmasına paralel olarak artan androjen reseptör aktivitesi meydana gelen fenotip üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Kadınlardaki NKAH sıklığı %1-10 arasında farklanma göstermektedir (454, 455). Polikistik overler aynı zamanda KAH'ın klasik ve klasik olmayan tiplerinde de görülebilir (456, 457) ve adrenal androjenlerin etkisi ile salınan gonadotropların salınmasındaki farklanma veya adrenal androjenlerin overlere olan direkt etkisi kaynaklı olabilir. Birbiri ile örtüşen biyokimyasal veriler ve ultrason görünümü gibi klinik veriler dolayısı ile PKOS tanısı olan kadınlarda NKAH olma olasılığının göz önüne alınması gerekmektedir (457) (14). Dolayısı ile PKOS ve NKAH'ı klinik olarak birbirinden ayırmak zordur (456-458). IR veya hiperinsülemi veya polikistik over varlığı hirsut kadınlar arasında NKAH'ı PKOS'dan ayıran klinikler arasında olabilmesine rağmen bu hipotez doğrulanmamıştır (457).

PKOS vakalarında andrenal ve overyan androjenlerdeki artış mevcuttur. PKOS'da primer androjen kaynağı over olup, adrenal androjenlerinde bazal ve kortikotrop uyarısında artmaktadır. Adrenal androjenlerin artışı primer andrenal androjen olan DHEA-S artışı ile bilinmektedir. DHEA-S periferdeki en çok bulunan steroid olup, yarılanma ömrünün uzun olmasından dolayı overyan döngü fazlarında oldukça stabildir. Artan DHEAS, PKOS tanısı alan kadınların %25'inde belirlenmiştir (459). Yapılan farklı çalışmalarda bu oran %60'lara artmıştır ve ayrıca artan DHEA, androstenedion ve 17-OHP, PKOS hastalarında belirlenmiştir (460). Dolayısı ile artan adrenal androjenlerin PKOS gelişiminde katkısı olabilir. Adrenal androjenlerin periferde östrojen veya daha fazla potent olan androjenlere dönüşerek gonadotropin salınımını etkileyerek PKOS gelişimine neden olduğu düşünülmektedir. Bu durum glukokortikoid verilimi ile geriye döndürülebilir. Puberte öncesi artan stresin adrenal androjen artışına

bağlı olarak erken adrenarşa ve PKOS oluşumuna artan risk teşkil etmektedir ve dolayısı ile genetik hastalık olan NKAH'da polikistik over, artan overyan androjen ve artan LH göstermeleri ile andrenal androjenlerin PKOS gelişiminde rolü olabileceğini göstermektedir (457, 461). Çoğu PKOS vakalarında 21OH eksikliği andrenal hiperandrojenemiye neden olmamakla birlikte, farklı çalışmalar bu vakalarda *CYP21A2* heterozigotluk sıklığını ve etkisini PKOS gelişimin de etkisini araştırmaktadır. Diğer taraftan farklı steroidojenik enzimi kodlayan genler üzerinde mevcut olan değişimlerin PKOS gelişimi üzerine olan etkisi bilinmemektedir (462).

2.10. CYP11B1

2.10.1. CYP11B1 Gen ve Özellikleri

Glukokortikoid ve mineralokortikoid sentezinin son basamağı birbirine yakından ilişkili iki mitokondrial enzim (*CYP11B1* ve *CYP11B2*) tarafından katalizlenmektedir (463, 464). Bu iki izoenzim 8. kromozom üzerinde 8q21-22'de yer almakta olup, birbiri ardına duplike olan iki gen tarafından kodlanmakta ve birbirlerine aminoasit seviyesinde yaklaşık %93 homolojiye göstermektedir (465). *CYP11B1* ve *CYP11B2* genleri birbirleri ile sadece 40kb mesafede olup bütün mitokondriyal P450 genleri ile aynı intron/ekzon yapısına sahiptirler. P450c11 genlerinin ikiside IMM'de bulunur ve reaksiyonu katalizlemek için NADPH'dan elektronu ferrodoxin ve ferrodoksin redüktaz aracılığı ile alır (466). İki izoenzimden daha çok eksprese olanı *CYP11B1*'dir ve 11-deoksikortizolün kortizole, DOC'un kortikosterona dönüşümünü katalizler ve dominant olarak zona faskikülatada eksprese olur, az oranda zona resikülaristede ekspre edilir fakat zona glomerülosada eksprese edilmemektedir (467).

P450c11B eskpresyonu ACTH tarafından, cAMP (siklik adenozin monofosfat) aracılığı ile uyarılmakta ve glukokortikoid tarafından baskılanmaktadır. Daha az eksprese olan izoform P450c11AS sadece zona glomerülosada eksprese olur ve 11β-hidroksilaz, 18-hidroksilaz ve 18-metiloksidaz (aldosteron sentaz) aktivitelerine sahiptir, dolayısı ile DOC'dan aldosteron sentezini gerektirecek bütün basamakları katalizlemektedir (468-470).

Her iki enzimde DOC'u kortikosteron ve kortikosteronu 18OH-kortikosterona dönüştürme kabiliyeti vardır fakat sadece *CYP11B2* aldosteron sentezini 18OH-kortikosteron kullanarak gerçekleştirebilir. P450c11B'nin zayıf 18-hidroksilaz aktivitesi (153), *CYP11B2*'nin baskılanmasına rağmen adrenalde devam eden 18OH-

kortikosteron sentezini açıklamaktadır (471). *CYP11B2* sentezi, potasyum ve anjiyotenzin II aktivitesi olan protein kinaz C tarafından uyarılmaktadır (472) ve SF1 (steroidojenik faktör 1) ve NURR1 (nükleer reseptör ilişkili 1) proteini gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu gerektirir (473).

2.10.2. CYP11B1 Eksikliği

11-hidroksilaz (P450c11), 11-deoksikortizolün kortizole, DOC'un kortikosterona dönüşümünü zona fasikülatada katalizler ve 11-hidroksilaz eksikliği (11OHD), *CYP11B1* geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Bugüne kadar 100 den fazla farklı *CYP11B1* mutasyonu belirlenmiştir (474-476). Mutasyonların çoğunluğu nokta mutasyonları, anlamsız (nonsense) mutasyon olup, buna ilave olarak kesim bölgeleri (splice-site) mutasyonları, küçük delesyon ve insersiyonlar ve komplex yeniden düzenlemeler (*CYP11B1* ve *CYP11B2* arasında belirlenen)'de belirlenmiştir. Genotip ve fenotip arasında net bir bağlantı virilizasyon derecesi veya hipertansiyonun şiddeti arasında belirlenmemiştir (477-479).

11OHD Avrupa popülasyonunda yaklaşık olarak KAH vakalarının %5-8 (474), Müslüman ve Yahudi toplumlarında ise %15'ini oluşturmaktadır (480).

2.10.3. Klinik Bulguları

11β-hidroksilaz eksikliği virilizan KAH ve klasik olmayan KAH olmak üzere klinik bulgulara göre ikiye ayrılır. Virilizan KAH genellikle hipertansiyon ile birlikte görülür. Normal olmayan adrenal steroid sentezi salınan mineralokortikoid miktarını etkiler ve bu durum tuz azalımı ve adrenallerde volüm artışına neden olur (475). Virilizan ve hipertansiyon klasik 11β-hidroksilaz eksikliğinin neden olduğu primer klinik bulgulardır. Fetal gelişim enzimatik anomali sonucu androjen öncülerinin artışına ve bu durum ambiguis genital (kız bebeklerde female psödohermafroditizm veya 46, XX cinsiyet anomalileri) oluşumuna neden olur. Genital yapının iç kısımları normal, dış görünüm itibari ile penise benzediği için genellikle erkek bebek olarak değerlendirilir. Doğum sonrası sürekli adrenal androjen fazlalığı tam olgunlaşmamış ve normal olmayan sekonder cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Kız çocukları, çocukluk dönemlerinde artan agresif tavır ve hareketler gösterebilir (475). Bu gibi davranışsal anomalilere, penis ya da klitoral büyüme, aksiller pubik ve yüz kıllarının çıkması, akne, sesin kalınlaşması ve hızlı gelişen iskelet yapısı eşlik edebilir (481). Hipertansiyon klasik 11BOHD hastalarında sık görülen fakat her zaman için 11OHD ile

bağlantılı olarak ortaya çıkmayabilir, bu durum bütün hastaların üçde ikisinde belirlenmiştir. DOC'un fazla üretimi, mineralokortikod reseptörüne bağlanmasından dolayı tuz tutulumu ve hipertansiyona neden olabilir (463, 482-485) Yüksek kan basıncı genellikle geç çocukluk ya da adolesen dönemde fark edilmesine rağmen infant dönemde 3 aylık olan vakalarda da bulunduğu rapor edilmiştir. Hipertansiyonun ciddiyeti, diğer klinik bulgular ile doğru orantılı olarak ortaya çıkmaz. Bazı vakalarda ağır virilizan olmasına rağmen tansiyonun normal olduğu, fakat hafif virilizan vakalarda ise severe hipertansiyon belirlenmiştir. Uzun dönem kontrol edilemeyen hipertansiyon, kardiyomiyopati, retinal damar tıkanması ve körlük gibi komplikasyonlara neden olduğu rapor edilmiştir. Tuz tutulumuna bağlı olarak eş zamanlı potasyum tükenimi (hipokalemi) gelişmektedir fakat meydana gelen hipokaleminin şiddeti farklılık gösterir. Renin üretimi, minerakortikoide bağlı olarak gelişen tuz tutulumu ve adrenal volüm artışı tarafından baskılanır. Aldosteron üretimi, düşük serum potasyum ve plazma renin konsantrasyonuna bağlı olarak azdır (481, 486, 487).

Klasik olmayan 11OHD, *CYP11B1* geninde meydana gelen ve kısmi aktivite kaybına neden olan mutasyonlar neticesi ortaya çıkmaktadır (482, 488) ve fenotip olarak klasik olmayan 21OHD ile benzerlik gösterir (483). 11OHD'nin klasik olmayan formu genellikle çocukluk dönemlerinde görülen androjen fazlalığı semptomları olan erken puberş ve hafif virilizasyon ile ortaya çıkar, etkilenen kız çocukları normal genital ile doğar, fakat ergenlik dönemlerinde hirsutizm, oligomenore ve polikistik over benzeri semptomlar sergiler, aynı zamanda hirsutizm ve oligomenore gibi bulgular gösteren az sayıda kadın hastada 11OHD bağlı NKAH belirlenmiştir (482). Klasik olan formuna göre NKAH'da arteriyel hipertansiyon çok nadir görülür.

11OHD'nin hormonal tanısı yüksek DOC ve S ile konulurken, klasik olmayan vakalarda kosintropin (cosyntropin-ACTH) uyarımına olan yüksek cevap ile konulabilir (489).

2.10.4. Patofizyolojisi

Ağır 11OH eksikliği, kortizol seviyesini azaltmakta, KAH ve etkilenen kız çocuklarda virilizasyona neden olmaktadır. Kortizol üretimindeki anomali 11-deoksikortizol birikimine ve dolayısı ile mineralokortikoid kaynaklı hipertansiyona neden olmaktadır. Her ne kadar DOC aldosterondan daha az etkili olsada 11OHD, DOC'un daha fazla sentezine neden olabilir dolayısı ile tuz kaybı olmaz ve serum sodyum normal

seviyelerde görülür. Her ne kadar DOC'un fazla üretimi hipertansiyona neden olsada etkilenen yenidoğan bebekler hafif ve geçici tuz kaybına maruz kalabilir (480, 490). İhtimal ile bunun nedeni yenidoğanların mineralokortikoidlere nisbeten fazla olan direnci gösterilebilir. Üretilen DOC seviyesi, serum potasyum ve kan basıncı genellikle virilizasyonun derecesi ya da kardiyovasküler anomalilerin gelişmesi ile çok zayıf korelasyon gösterir (472).

Yeni doğan bebekler yüksek 17OHP birikimi görülmektedir ki, 17OHP sentezi 11OH enzimatik defektin olduğu reaksiyondan sadece iki basamak önce meydana gelen bir reaksiyon olup, büyük olasılıkla 11-deoksikortizolün yüksek konsantrasyonu *CYP21A2* enziminide bloke etmekte ve *CYP21A2* eksikliği tanısı için yapılan yenidoğan taramalarında 11OHD'nin de belirlenebilme olanağı sunmaktadır (485, 491).

2.11. HSD3β2

2.11.1. HSD3β2 Gen ve Özellikleri

İzoenzim olan tip I ve tip II, 3βHSD enzimleri protein seviyesinde yaklaşık %93 homolojiye sahip olup, 1. krozom üzerinde 1p13.1 lokusunda yer alan *3βHSD1* ve *3βHSD2* genleri tarafından kodlanır (492, 493). Klasik 3βHSD eksikliğine neden olan mutasyonlar *3βHSD2* geni üzerinde meydana gelen ve kısmi veya tam enzim inaktivasyonuna neden olmaktadır. *3βHSD2* geni 4 ekzondan oluşmakta olup, bunlardan sadece 3 tanesi protein kodlamaktadır ve gen yaklaşık 8kb büyüklüğündedir. Bugüne kadar çok sayıda gen üzerinde tanımlanmış mutasyon mevcut olup bunlar nokta, çerçeve kayması, anlamsız ve alternatif kesim bölgesi mutasyonlarıdır (2, 494). *3βHSD2* geni 371 amino asitten oluşmakta olup, kofaktör bağlanma domain, ligand-bağlanma domain ve iki membran-spanning domain olmak üzere 4 fonksiyonel domain ihtiva eder. Diğer taraftan *3βHSD1* genine ait bilinen bir mutasyon söz konusu değildir buda bu genin fonksiyonunun fetal gelişim ve fetal steroid biyosentezi için zorunlu olan fonksiyonunu göstermektedir (495-498).

2.11.2. HSD3β2 Eksikliği

3βHSD2 eksikliği, KAH'ın nadir görülen formlarından olmakla birlikte *3βHSD2* enziminde meydana gelen anomali kaynaklı glukokortikoid ve minarolokortikoid eksikliği tedavi edilmezse çocukluk döneminde ölüm ile sonuçlanabilir (499). *3βHSD2* geni adrenal ve gonadlarda fonksiyon sahibi olduğu için eksikliği her iki dokudaki

glukokortikoid ve minarolokortikoid ve cinsiyet hormon biyosentezenin tamamını etkilemektedir (500)

3βHSD1'in periferal ekspresyonu, *3βHSD2* eksikliğinin hormonal tanısını güçleştirmektedir. *3βHSD2* eksikliğine sahip bebeklerde düşük serum 17OHP beklenirken, bazı vakalarda 21OHD'de beklendiği gibi oldukça yüksek serum 17OHP bulunabilmektedir (501).

2.11.3. Klinik Bulguları

3βHSD2 eksikliği yüksek oranda heterozejenite gösteren klinik bulgularla kendisini gösterir. En ağır formu bebeklik (infant) döneminde tuz kaybına neden olmakla birlikte tedavi edilmediği takdirde ölümle sonuçlanır. Diğer taraftan diğer klasik formu tuz kabına neden olmazkan, hafif veya klasik olmayan tipide mevcut olup bu formu genellikle çocukluk çağının sonu ya da ergenlik dönemine kadar belirgin kliniğe neden olmaz.

Klask form *3βHSD2* eksikliğinde etkilenen 46,XX bebekler gerek artan DHEA gerekse artan DHEA'nın periferde *3βHSD1* tarafından testosterona dönüşümü nedeni ile hafif ve orta dereceli klitoromegaliye ve ileri yaşlarda ki bayanlarda artan androjenik akne, PP, artan linear ve kemik büyümesine neden olabilir. PP olan çocuk veya oligomera, hirsutizm ve hafif derecede artan DHEA ve 17OHP sahip olan yetişkin kadın bireylerde çok nadir *3βHSD2* gen üzerinde mutasyon belirlenmesi nedeni ile klasik olmayan *3βHSD2* eksikliği oldukça nadir olarak görülen olgudur (502-504).

Etkilenen 46,XY bebeklerde yine aynı şekilde periferde *3βHSD1* tarafından DHEA'nın testosteron gibi daha potent androjenlere dönüşümü söz konusu olmasına rağmen üretilen androjen erkek genital gelişimin tamamlanması için yeterli olmadığı için farklılık gösteren ambigus genital, küçük fallus ve ağır hipospadiasa sahip olabilir (2).

2.12 AR (NR3C4)

2.12.1 AR Geni ve Özellikleri

Nükleer reseptörler, hücre içerisinde bulunan ve steroid, tiroid hormon ve bazı belirli moleküllerin algılanmasından sorumlu olan protein ailesidir. Buna karşılık olarak bu reseptörler spesifik genlerin ifadesinin düzenlenmesinde görev alan diğer proteinler ile birlikte çalışarak, organizmanın metabolizma, homeostaz ve gelişim gibi olayların kontrolünde görev alırlar.

Nükleer reseptörler DNA'ya direkt olarak bağlanma ve yakınındaki genlerin ifadesini düzenleme yeteneklerine sahiptirler ve bu özelikleri ile transkripsiyon faktörü olarak sınıflandırılırlar. NR'ların bu fonksiyonu yerine getirmesi için ya da reseptör davranışının değişmesi için ortamda uygun ligandın bulunması gerekmektedir (505, 506).

Filogenetik analizler sonucu bu üstfamilya içerisinde üç ana altfamilya belirlenmiştir. Tip I altfamilya veya steroid familyası progestin, östrojen, androjen, glukokortikoid ve mineralokotrikoid reseptörlerini ihtiva etmektedir. Ligandın olmadığı durumlarda reseptörler ısı şok proteinlerine bağlanırlarak inaktif formda kalırlar. Uygun ligand varlığında hedef genlerin promotöründe bulunan palindromik tekrarlarına homodimerik olarak bağlanır. Tip II reseptörler olan TR (tiroid hormon reseptörü), VDR (vitamin D3 reseptörü) vb ihtiva eder. Liganddan bağımsız olarak hedef genlerin promotörlerine bağlanarak genlerin ifadesinde basklılayıcı rol oynarken, ligandın varlığı durumunda uygun liganda bağlanarak hadef genler üzerinde neden olduğu baskılayıcı etkisini ortadan kaldırır. Tip III reseptörler orphan reseptörleri ihtiva etmektedir.

AR, NR'nin steroid ailesi üyesi olup, X kromozomu üzerinde sentromer ve kromozomum q13 bölgesi arasında yer almaktadır. *AR* geni 75-90kb arasında değişen büyüklükte ve cDNA'sı 8 ekzondan oluşmaktadır. Üretilen protein 910-919 amino asit ve 110-114kDa büyüklüğünde olup belirlenen varyasyon TAD (transaktivasyon ya da N terminal domain)'da yer alan poliQ bölgesinden kaynaklanmaktadır. Diğer steroid reseptörlerinde olduğu gibi AR proteini, TAD, DBD (DNA-bağlama domaini), hinge bölgesisi (hinge region domain) ve LBD (ligand-bağlama domaini) olmak üzere 4 farklı kısımdan oluşmaktadır. TAD ekzon1, DBD ekzon 2 ve 3, hinge bölgesi ekzon 4 ve LBD ise ekzon 5-8 üzerinde yer almaktadır. Diğer steroid reseptörleri ile olan sekans homolojisi sadece son iki domaininde mevcuttur.

AR'nin iki doğal ligandı mevcut olup, bunlar testosteron ve testosteronun daha potent metaboliti olan DHT iken, androstenedion ve DHEA daha zayıf olarak AR'ye bağlanabilir. Hepside, *AR*'ye bağlanma ve hedef genleri transkripsiyonel seviyede ifadesini etkileme potansiyeline sahiptir (507).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dekanlığı 24.01.2014 tarihli 2010/40 karar numarası ve 04.04.2014 tarihli, 2014/238 karar numaralı etik kurul onay belgesinin temini ile tezin fiilen çalışılmasına başlanmıştır. TDK-2014-5099 proje kodlu Doktora tezi projesinin 28.05.2014 tarihli 2014/7 toplantı numarası ve TCD-2014-5098 proje numaralı çok disiplinli araştırma projesinin 17.06.2014 tarihli, 2014/9 toplantı numarası ile desteklenmesine karar verilmiştir. Çalışma grubu, Erciyes Üniversitesi Yetişkin Endokrin Bilim Dalı polikliniğine hirsutizm şikayeti ile gelen kadın hastaların ve Erciyes Üniversitesinin farklı fakülte ve yüksekokullarında eğitim gören yetişkin kadınların gönüllülük esasına dayanan katılımları ile oluşturulmuştur. Çalışmanın genetik analizleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD ve Genom ve Kök Hücre Merkezinde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubu hirsutizm, kellik, akne veya oligomenore gibi şikâyeti olan 122 kadına ilave olarak hiçbir klinik şikâyeti olmayan kan bankasına kan veren ya da verme potansiyeli olan premenapozal 18-45 yaş arası 270 kadın katılımcıya ait iki grubun oluşturduğu toplamda 392 gönüllüden oluşmaktadır. Çalışma grubu tamamen gönüllülük esasına dayanmakta olup, her katılımcıya çalışma hakkında bilgi verilmiş ve Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam formu imzalatılmıştır.

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler

3.2.1. Cihaz-Alet Listesi ve Üretici Firmalar

Kullanılan cihaz/alet ve üretici firmalara ait bilgiler aşağıda listelenmiştir (Tablo 3.1). Erciyes Üniversitesi, Tıbbi Genetik AD ve Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde mevcut olan cihazlar kullanılmıştır.

Tablo 3.1. *Kullanılan Cihaz İsimleri ve Üretici Firma İsimleri.*

Cihaz İsmi	Üretici Firma
Nanodrop 2000	ThermoScientific
Yatay Elektroforez	Biorad
Ultraviyole Transillüminatör	Vilber Lourmat
Doğru Akım Güç Kaynağı	Biorad
Hassas Terazi	Libror AEG-220
Dondurucu (-20^{o}C)	Uğur
Karıştırıcı/Çalkalayıcı	Mixmate Eppendorf
Isıtıcı Blok	Eppendorf
Otomatik Mikropipet Seti	Gilson
Genetik Analizatör	Hitachi ABI 3500
PCR thermocycler	ABI Geneamp PCR System 9700
Distile Su Cihazı	Millipore
Vorteks	Eppendorf
Mikrosantfirüj	Heraus
Mikrodalga Fırın	Siemens
Buz Dolabı	Siemens
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter

3.2.2. Sarf Malzemele Listesi ve Üretici Firmalar

Çalışmanın yapımı esnasında kullanılan sarf malzemelere ait liste aşağıda listelenmiştir (Tablo 3.2). Malzemelerin temini firmaların Türkiye temsilcilikleri ve/veya yetkilendirdikleri firmalar aracılığı ile sağlanmıştır.

Tablo 3.2. *Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemelerin Listesi ve Üretici Firmalar.*

Sarf Malzeme İsmi	Üretici Firma
DNA izolasyon Kiti	Roche-Magne Pure LC
Primer (Oligo)	Metabion ve/veya İnvitrogen
Floresan İşaretli Primer	İnvitrogen

Agaroz	İnvitrogen
EtBr	İnvitrogen
10xTBE Buffer	İnvitrogen
Etanol	Sigma
İsopropanol	Sigma
dNTP	Invitrogen
Amplitaq Gold Master Mix	Invitrogen
Hifi DNA Polimeraz	Invitrogen
Platinium DNA Polimeraz	Invitrogen
BigDye terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit	Invitrogen
Capillary Array 50cm	Invitrogen
POP-7 Polimer	Invitrogen
Anot Buffer Container	Invitrogen
Katot Buffer Container	Invitrogen
Septa 96 well	Invitrogen
Septa Cathode Buffer Container	Invitrogen
Genetic Analyzer 96 -Well Reaction Plate with Barcode	Invitrogen
Conditioning Reagent	Invitrogen
Exo-SAP	Invitrogen
BigDye Terminator Purification Kit	Invitrogen
100bp DNA Boyut Marker	Invitrogen
MikroPipet ucu (10-100-1000µl)	Axygen
1.5 ve 0.5ml ml Eppendorf Tüp	Axygen
0.2 ml PCR tüpü	Axygen

3.3. Hasta Veri ve Materyallerinin Toplanması

3.3.1. Klinik Tanı ve Kriterleri

Tiroid disfonksiyon, Cushing sendomu, androjen salgılayan over ve böbrek üstü bezi tümörleri ve hiperprolaktinemi'li ya da diyabet gibi metabolik hastalığı olan bireyler çalışmaya dâhil edilmemiştir. Gönüllüler, klinik değerlendirmeye tabi tutularak foliküler dönemde progesteron, kortizol, LH, folikül uyarıcı hormon, SHBG (seks hormonu bağlayıcı globin), total testesteron, DHEAS, androstenedion, ACTH hormon değerleri ölçülmüş, isteyen gönüllülere böbreküstü bezlerinin ve overlerin görüntülenmesi için ultrason uygulanmıştır. **PKOS, IH (idiyopatik hirsutizm), IHA (idiyopatik hiperandrojenemi), izole androjen fazlalığı aşağıdaki kriterlere göre belirlenmiş ve OKS (oral kontraseptif) kullanan grup ayrıca belirtilmiştir.** Çalışmaya katılan gönüllülere, tanılarından bağımsız olarak çalışmanın ve takibin kolaylığı açısından 1'den 392 'e kadar numara verilmiştir.

AE-PKOS (Androgen Excess and PCOS) derneğinin PKOS'un tanımı için oluşturdukları kriterler 1.Hiperandrojenizm: hirsutizm ve/veya hiperandrojenemi ve

2.Ovaryan disfonksiyon: Oligoanovülasyon ve/veya PKO morfolojisi, bu 2'sinin varlığı tanıyı koydurur. Tanı konulmadan önce benzer klinik özelliklere sahip konjenital adrenal hiperplazi, androjen salgılayan tümörler, Cushing Sendromu ve hiperprolaktinemi dışlanmıştır. Oligoovülasyon ovülasyonun 35 günden daha uzun aralıklarla olması olarak tanımlanır ve bu süreden uzun olanlar oligoovülasyon olarak kabul edilmiştir. PKOS tanı kriterleri farklılık göstermekte olup, tanı kriterleri Tablo 3.3'de özetlenmiştir. Çalışma gönüllülük esasına dayandığı için her hastanın over ultrasonu mevcut olmayıp, USG'si olmayan bireylerde adet düzensizliği, plazma androjen seviyeleri ve hirsutizm/hioerandrojenemi semptomları kriter alınarak tanı konulmuştur. USG'de PKO morfolojisi herbir overde 2-9 mm çapında 12 veya daha fazla folikül olması ve/veya over hacminde artış (>10 ml) olarak tanımlanmıştır. Ayrıca bir overde bu özelliklerin bulunması tanı için yeterli kabul edilirken bu tanımlamanın oral kontraseptif kullanan kadınlara uygulanamayacağı belirtilmiştir. **IHA** olarak tanımladığımız grup, androjen fazlalığı ile karakterize fakat düzenli ovulasyon döngüsüne ve normal over görünümüne sahip kadın hastalarda belirlenmektedir. **IH** normal androjen seviyelerinde, düzenli ovulasyon ve normal over görünümüne sahip hastalarda ortaya çıkmaktadır. Hirsutizm değerleri, herbir gönüllü için Ferriman-Gallwey skorlaması (FGS) (0-36) temel alınarak yapılmıştır. **İzole androjen fazlalığı,** artan androjen seviylerinde sahip olmasına rağmen hiperandrojenemi semptomları göstermeyen gruptur. **NKAH,** ACTH stimülasyon testinde, en yüksek 17-hidroksiprogesteron değerlendirmeye alınmış ve bu seviyenin >10 ng/mL üzerinde olması biyokimsayasl olarak 21OH'a bağlı NKAH olarak tanımlanmıştır. ACTH testine olan 11-DOC cevabının normale göre üç kattan fazla olması durumu 11OH eksikliğine bağlı NKAH olarak değerlendirilmiştir (508).

Tablo 3.3. *PKOS Tanı Kriterleri.*

NIH 1990	1.Hiperandrojenizm ve/veya hiperandrojenemi 2.Oligoovülasyon 3.Diğer nedenlerin dışlanması
ESHRE/ASRM Rotterdam 2003	1.Oligo ve/veya anovülasyon 2.Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenemi 3.USG'de polikistik over görünümü -Diğer nedenler dışlandıktan sonra 3 kriterden 2'si olmalı.

AE-PCO Society Kriterleri-2009	1.Hiperandrojenizm: Hirsutizm ve/veya hiperandrojenemi 2.Ovaryan disfonksiyon: Oligoanovülasyon ve/veya PKO morfolojisi -Diğer nedenler dışlandıktan sonra iki kriter de olmalı.

3.3.2. DNA İzolasyonu ve Aday Genler

Genetik analizlerin yapılması için gönüllülerden 3 ml periferik kan örnekleri EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) ihtiva eden tüp içerisine alınmıştır. DNA izolasyonu, Roche Magna pure izolasyon kiti kullanılarak üretici firma tarafından önerilen protokol takip edilerek yapılmıştır. DNA izolasyonunu takiben DNA kalitesi, Nanodrop 2000 cihazı kullanılarak kontrol edilmiş, alınan 260/280 OD oranının 1.8-2.0 arasında olması kriter olarak alınmıştır. Elde edilen DNA'lar hastalara verilen numaralara göre kısa dönemde +4^{o}C, nisbeten uzun dönemde -20^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen genomik DNA'dan, adrenal ve over/testis gibi dokularda steroid biyosentez yolağında görev alan *CYP21A2*, *CYP11B1*, *HSD3β2*'nin protein kodlayan bütün ekzonlarında ilave olarak *CYP21A2* genini proksimal ve kor promotör bölgesi baz değişimleri DNA dizi analizi, farklı dokularda androjen fonksiyonunda görev alan AR geninin ise birinci ekzonunda yer alan CAG tekrar polimorfizmi fragman analizi ile belirlenmiştir.

3.4. DNA Dizi Analizi

3.4.1. PCR ve PCR Ürünü Temizlenmesi

DNA dizi analizi yapılacak olan gen veya gen bölgeleri, bölgeye özgü olarak dizayn edilen primer çiftleri kullanılarak PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltılmıştır (Tablo 3.4). *CYP21A2* geni ve promotör bölgesi birer, *CYP11B1* ve *3βHSD2* geni üç ayrı ve *AR* genin ilgilenilen kısmı bir PZR reaksiyonunda çoğaltılmıştır.

PZR reaksiyonları, *CYP21A2* geni için Hifi Platinium DNA Taq polimeraz, *CYP11B1* ve *3βHSD2* genleri için Platinium Taq polimeraz, *AR* geninde ise Amplitaq Gold Master Mix kullanılarak üretici firma olan Invitrogen'in protokolüne uygun olarak son hacim 25µl olacak şekilde yapılmıştır. Herbir PZR reaksiyonu için 50ng genomik DNA kullanılmıştır. PZR reaksiyonları, Life Biotechnology (Applied Biosystem) Geneamp PZR System 9700 cihazı kullanılarak 35 siklus uygulanmıştır. *AR*, geninin çoğaltılmasında fragman analizine olanak vermesi için forward primer VIC ile

işaretlenmiştir. Uygulanan primer bağlanma sıcaklıklarına ait değerler Tablo 3.4'de yer verilmiştir.

PZR reaksiyonunu takiben elde edilen PZR ürünleri, %1'lik, 1xTBE tamponu kullanılarak, EtBr ihtiva eden agaroz jelde UV-transillimünatör kullanılarak görüntülenmiş ve büyüklükleri 100bp DNA boyut marker kullanılarak kontrol edilmiştir.

Tablo 3.4. *PZR Reaksiyonları İçin Kullanılan Primer Dizileri, Uzunluk ve Bağlanma Sıcaklıklarına Dair Bilgiler.*

Gen İsmi	***PZR Primer***	***Bağlanma sıcaklığı***	***Uzunluk***
CYP21A2			
gDNA	5' CGGGTCGGTGGGAGGGTA 3' 5' GCCATCTCGCAGCACTGTGT 3'	65^{o}C	2935pb
Promotör	5' TTCAGGCGATTCAGGAAGGC 3' 5' CAGAGCAGGGAGTAGTCTC 3'	56^{o}C	1146bp
CYP11B1			
Ekzon1-2	5' TCCCTCTCGAAGGCAAGGCACCA 3' 5' CTGCTCCCGCTCTCAGCTCGC 3'	69 ^{o}C	850bp
Ekzon 3-5	5' CTTGCAGAAAATCCCTCCCCCCTA 3' 5' GGACACGTGGGCGCCGTGTGA 3'	69 ^{o}C	1415bp
Ekzon 6-9	5'TGACCCTGCAGCTGTGTCTCCTG 3' 5' CCATTTGTGCTGGGGCTGGTTAGA 3'	69 ^{o}C	1666pb
HSD3β2			
Ekzon 2	5' CTCCAGTCCTTCTTCCTCCAGGG 3' 5' AGGTCAACCTCCCCACACCC 3'	68 ^{o}C	503bp
Ekzon 3	5'TCACGGATGTGTGACAATTC 3' 5'CTGATCCTCATTTAATCAAC 3'	50 ^{o}C	479bp
Ekzon 4	5' CATGTGGTTGCAGCTCCTTT 3' 5' GAAGAAGACAGTAAGTTGGG 3'	66 ^{o}C	1020bp
AR			
	VIC-5'TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC3' 5'GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCTCAT3'	56 ^{o}C	~288bp

Elde edilen 5µl PZR ürünü arta kalan primer ve dNTP'lerden arındırılması için, 2µl exo-sap ile karıştırılarak, 15dk 37^{o}C'yi takiben 15dk 85^{o}C'de inkübe edilerek sekans PZR'ına hazır hale getirilmiştir.

3.4.2. Sekans PCR ve PCR Ürünün Temizlenmesi

3.4.2.1. Sekans PCR

CYP21A2 geni, promöter dâhil 11, *CYP11B1* geni 9, *HSD3β2* geni 4 ayrı reaksiyon ile DNA dizi analizi yapılmıştır. Her reaksiyon ekzona özgü sekans primerleri kullanılarak

(Tablo 3.5), BigDye terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit ile üretici firmanın protokolüne uygun olarak son hacim 10µl olarak hazırlanmıştır. 1 pmol sekans primerinden 2 µl kullanılmıştır. Sekans PZR'ı genlerin tamamında, 50^{o}C bağlanma sıcaklığı ve uzama basamağı 60^{o}C'de 4dk olarak uygulanmıştır. Reaksiyonlar 96-kuyucuklu tabaklar kullanılarak hazırlanmıştır. Gerekli görüldüğü durumlarda okuma aynı bölge için çift yön, gerek görülmeyen durumlarda ise tek yön okuma ile değerlendirme yapılmıştır. Yeni mutasyonlar ikinci bir PZR ve yeni bir okuma ile konfirme edilmiştir.

Tablo 3.5. *Kullanılan Okuma Primer Dizileri.*

İlgili Gen ve Primer ismi	***Primer dizisi***
CYP11B1seq1F	5' GAT TGC AGC TGA ACA GGG TGG A 3'
CYP11B1seq1R	5' TGG CAG TGC TGA GTG CC 3'
CYP11B1seq2F	5' CTG TGA AGC CGC TAA T3'
CYP11B1seq2R	5' CAG GCT GCC CAC CCA GC 3'
CYP11B1seq3F	5' TTG CTG GGG CGG CCT CA 3'
CYP11B1seq3R	5' TGG CCA CTC CAG GGT CTC TG 3'
CYP11B1seq4F	5' CCT TGT GCT CAG CAG TG 3'
CYP11B1seq4R	5' CCT TCC CCA TAG CAC TG 3'
CYP11B1Seq5F	5' GAG GAC ACT GAA GGA TG3'
CYP11B1Seq5R	5' GCT TGG CAT CAC CCT CT 3'
CYP11B1seq6F	5' CCT CCT GTG CAA GGT CTG 3'
CYP11B1seq6R	5' CCA GGG CCA CAG GGA GG 3'
CYP11B1seq7F	5' TCT GGG ACC TCT GCG GGT 3'
CYP11B1seq7R	5' GGA TCA GGG AAT GAC TG 3'
CYP11B1seq8F	5' CAG TCA TTC CCT GAT CC 3'
CYP11B1seq8R	5 'CAA TCA CAC CAT GCA AGC 3'
CYP11B1seq9F	5' CCC CCT TCA GCA TAA TC 3'
CYP11B1seq9R	5' TTT GTG CTG GGG CTG GTT AG 3'
CYP21A2seq1F	5' CTC TTG AGC TAT AAG TGG 3'
CYP21A2seq1R	5' ACA CCC AAA GCA GCG TCA 3'
CYP21A2seq2R	5' GCA TAG CAA GAA CCC ATC 3'
CYP21A2seq2F	5' AGA GGC TGA TCT CGC TCT 3'
CYP21A2seq3R	5' CGA GGC TGA CCC GAG GTG GC 3'
CYP21A2se3F	5' CAT ATC TGG TGG GGA GAA 3'
CYP21A2seq4F	5' CTG CTG AAC TCA CAC TGT 3'
CYP21A2seq4R	5' AGG ACA AGA GGA GAG GCT AC 3'
CYP21A2seq5/6F	5' ACT CGG AGA GGA ACA GGA 3'
CYP21A2seq5/6R	5' ATC GGC TGT GGG CGG AG 3'
CYP21A2seq7R	5' CCA CCG CCC TGG CCA GGT TG 3'
CYP21A2seq7F	5' TTG CCA CTC TGT ACT CCT 3'
CYP21A2seq8F	5' TTT TTT TGC TTC ACC ACC CTG 3'
CYP21A2seq8R	5' TTT CCT CAC TCA TCC CCA 3'
CYP21A2seq9F	5' TGG GGA TGA GTG AGG AAA 3'
CYP21A2seq9R	5' CCA CAT TTT CAC GGC AGG 3'

CYP21A2seq10F	5’ AAA ATG TGG TGG AGG CTG 3’
CYP21A2seq10R	5’ AGA AAC TGA GGT ACC CGG 3’
CYP21A2proSeqF	5’ AGC AGC AGG CCC AGG 3’
3βHSD2seq2F	5’CTC CAG TCC TTC TTC CTC CAG GG 3’
3βHSD2seq2R	5’ AGG TCA ACC TCC CCA CAC CC 3’
3βHSD2seq3F	5’ TCA CGG ATG TGT GAC AAT TC 3’
3βHSD2seq3R	5’ CTG ATC CTC ATT TAA TCA AC 3’
3βHSD2seq4F	5’ ACT TTG TAC ACT TGT GC 3’
3βHSD2seq4R	5’ TGT GGC GGT TGA AGG G 3’

3.4.2.2. Sekans PZR Ürününün Temizlenmesi

Elde edilen sekans PZR ürünü, BigDye Terminator Purifikasyon Kit kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun olarak yapılmıştır. 10µl olan sekans PZR ürünü için, 45 µl SAM solüsyonu ve 10µl X-terminator solüsyonu eklenerek 1300 rpm’de 30dk çalkalanmıştır. Çalkalanma işlemini takiben 1000 rpm’de 2dk Beckman Coulter kullanılarak santrifüj edildikten sonra septa ile kapatılarak ABI3500 genetik analizatör cihazına yerleştirilmiştir.

3.4.2.3. Fragman Analizi

PZR ile çoğaltılan AR geninin gen bölgesi, fragman analizi için 0.5 µl PCR ürünü, 0.4 µl Liz 600 size standart ve 20 µl hidiformamid ile karıştırılarak 95^{o}C, 2dkdenatürasyonu takiben, 4^{o}C’de, 10dk bekletildikten sonra ABI3500 genetik analizatör cihazında örnekler yürütülmüştür.

3.4.3. ABI3500 Genetik Analizatör Cihaz Ayarları ve Sonuçların Analizi

3.4.3.1. ABI3500 Genetik Analizatör Cihaz Ayarları

DNA dizi analizi için kullanılan cihaz ayarları; koşma öncesi voltaj 18 kVolt, enjeksiyon voltajı 1.6 kVolt, enjeksiyon süresi 4 saniye ve örneklerin koşma süresi 1 saat 45 dk olarak uygulanmıştır.

Fragman analizi için kullanılan cihaz ayarları, ürünlerin koşma voltajı 19.5 kVolt, koşma öncesi voltaj 15 kVolt, injeksiyon voltajı 1.6 kVolt, injeksiyon süresi 4 saniye, koşma süresi 25dk olarak uygulanmıştır.

3.4.3.2. Sonuçların Analizi

CYP11B1, CYP21A2, 3βHSD2 gen DNA dizi analizi, NCBI (National Center for Biotechnology Information) kaynaklı referans dizi kullanılarak Seqscape V3.x (Applied

Biosystem) programında analiz edilmiştir. Mutasyon/değişimler Human Gene Mutation Dadabase kullanılarak kontrol edilmiştir. Belirlenen yeni değişimler için geniş yayın taraması veri tabanlarına ek olarak yapılmıştır.

AR genine ait fragman analizinde sonuçlar Genemapper 5.0 Full (Applied Biosystem) programı kullanılarak analiz edilmiş ve kullanılan boyut marker (size standart) temel alınarak fragmanların uzunlukları baz çifti olarak program tarafından otomatik olarak belirlenmiştir. Tekrar sayısı Baharaj ve ark. yaptığı çalışma esas alınarak hesaplanmıştır (509).

3.5. İstatistiksel Analizler

Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram ve q-q grafikleri ile, ayrıca Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda nicel değişkenler için Mann-Whitney U ve Kruskal-Wallis H testleri, nitel değişkenler için Pearson ki-kare analizi ve Fisher kesin ki-kare testi kullanıldı. Korelasyon analizleri için Spearman testi uygulandı. Verilerin analizi R 3.2.1 (www.r-project.org) yazılımı kullanıldı. $P<0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, toplam 392 kadın gönüllüden biyokimya testleri için alınan kan örnekleri sonuçları ve klinik verileri kullanılarak hastalar normal, PKOS, IH, IHA, NKAH ve izole androjen fazlalığı tanıları almıştır. Aynı gruptan alınan DNA örnekleri ise *CYP11B1, CYP21A2* (proksimal-kor promotör dâhil), *3βHSD2* ve *AR* genlerininde polimorfizim/mutasyon taranması için kullanılmıştır.

Bulguların net olarak sunulabilmesi için veriler 3 ayrı kısımda verilmiştir. **Birinci kısım, iki grup ayrı ayrı ele alınarak** klinik ve biyokimyasal verileri doğrultusunda konulan klinik tanıları verilmiştir. **İkinci kısım** gönüllü kadın bireylerin taranan aday genlerinde belirlenen bütün değişimler ayrı ayrı mevcut literatür bilgisi altında klinik bulgularından bağımsız olarak verilmiştir. **Üçümcü kısım** ise belirlenen ve hastalıkla ilişkili olan değişimler gen bazında hasta tanıları ile mukayeseli olarak sunulmuştur.

4.1. Hasta Tanıları

Hirsutizm şikayeti ile Endrokrin polikliniğine gelen 122 premenapozal hastanın, 94 birey PKOS (%77), 12 birey IHA (%9.8), 14 birey IH (%11.4) ve 2 birey NKAH (%1.6) tanısı almıştır.

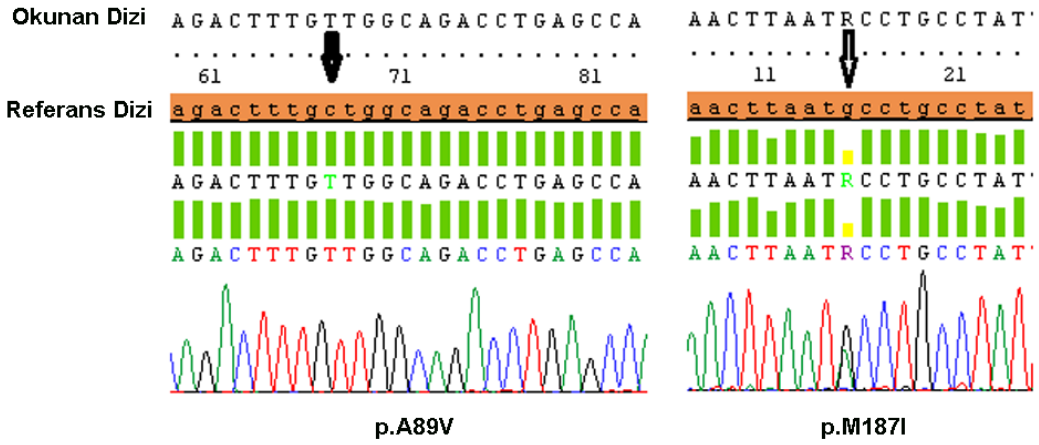
Normal popülasyondan çalışmaya katılan 270 premenapozal kadından, 172 birey normal (%63.7), 43 birey PKOS (%15.9), 12 birey IHA (%4.4), 7 birey IH (%2.6) ve 29 birey izole androjen yüksekliği (%10.7), 2 birey NKAH (%0.7) tanısı almıştır. OKS kullanımında olan 5 birey (%1.8) OKS'nin tanı kritelerlerini etkilemesinden dolayı OKS olarak ayrıca gruplandırılmıştır.

4.2. Kadın Gönüllülerde CYP11B1, CYP21A2, 3βHSD2 ve AR Genlerinde Belirlenen Değişimler ve Sıklığı

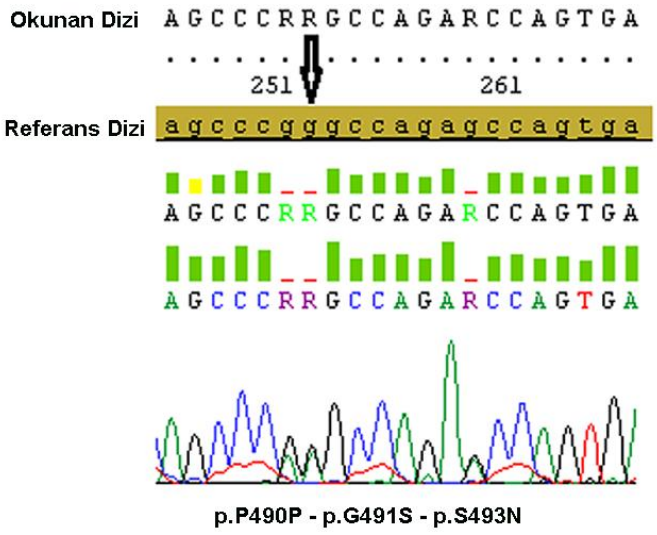
Çalışmaya katılan gönüllülerde belirlenen genetik değişimler bireylerde belirlenen yalın ve kombine değişimler olarak belirlenen birey sayısı ile birlikte verilmiştir.

4.2.1. CYP21A2 Geninde Belirlenen Değişimler

CYP21A2 genine ait protein kodlayan bütün bölgeleri ve ekzon-intron bağlantı bölgeleri açısından DNA dizi analizine tabi tutulan 392 gönüllüde anlamsız, sessiz, alternatif kesim bölgesi, yanlış anlamlı, baz ilave mutasyonları ve baz kayıpları olmak üzere 29 farklı değişim ekzon 4 haricinde mevcut olan bütün ekzonlarda belirlenmiştir. Meydana gelen değişimlerinin 12 tanesi sessiz, 1 tanesi alternatif kesim değişimi, 7 tanesi protein fonksiyonu üzerine etki eden yanlış anlamlı ve 1 tanesi baz ilave değişimleridir. Belirlenen 5 adet değişim yanlış anlamlı ve ilave değişimler grubuna dâhil olmasına rağmen protein fonksiyonu üzerine olumsuz etkisi belirlenmemiş olan grupu oluşturmaktadır. Listelenen 3 adet yanlış anlamlı değişim ise daha önce belirlenmemiş olup ilk kez tarafımızdan belirlenmiştir (Şekil 4.1 - 4.2 ve Tablo 4.1).



Şekil 4.1. *Belirlenen Yeni p.A89V ve p.M187I Değişimlerine Ait Elektrogram Görüntüleri. Ok işareti değişimin lokalizasyonunu göstermek için kullanılmıştır.*



Şekil 4.2. *Aynı Bireye Ait Allel Üzerinde Meydana Gelen Sırası ile p.P490P, p.G491S ve p.S493N Değişimlerinin Elektrogram Görüntüsü. Ok işareti p.G491S değişiminin lokalizasyonunu göstermek amacı ile kullanılmıştır.*

Tarafımızdan ilk kez belirlenen p.A89V (c.266 GCT>GTT) değişimi ekzon 2 üzerinde homozigot iken p.M187I (c.561 ATG>ATA) değişim ekzon 3 üzerinde, p.G491S (c.1471 GGC>AGC) değişimi ekzon 10 üzerinde heterozigot formda yer almaktadır (Tablo 4.1). p.G491S değişimi ekzon 1-8 arasında gen konversiyonu gösteren aynı bireye ait allel üzerinde belirlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. *CYP21A2 Geninde Belirlenen Değişimler ve Sıklığı. Mutasyon grubu, klinik üzerine etkisi ayrıca tabloda belirtilmiştir.*

CYP21A2	Değişimin ismi	Referans	Mutant	Mutasyon	Klinik etki	Homozigot (n)	Heterozigot (n)	Wt(n)
Ekzon 1	p.9_10insL		insCGT	Baz ilave	Normal	117	196	79
	p.L37L	T	C	Sessiz	Nd	5	108	279
	p.P45P	C	A	Sessiz	Nd	22	167	203
	p.Q53Q	G	A	Sessiz	Nd	0	1	391
İntron 2	**IVS2-13 C>G**	A,C	G	Alternatif kesim	Patolojik	0	4	388
Ekzon 2	****p.A89V**	C	T	YA	Nd	1	0	391
Ekzon 3	p.R102K	G	A	YA	Normal	74	194	124
	p.P105P	G	C	Sessiz	Nd	0	6	386
	p.L129L	G	A	Sessiz	Nd	0	1	391
Ekzon 5	p.D183E	C	G	YA	Normal	1	7	384

	****p.M187I**	G	A	YA	Nd	0	1	391
Ekzon 6	p.D210D	C	T	Sessiz	Nd	0	1	391
	p.D234D	T	C	Sessiz	Nd	0	6	386
Ekzon 7	p.L248L	C	G	Sessiz	Nd	13	157	222
	p.S268T	G	C	YA	Normal	9	112	271
	p.P267P	G	T	Sessiz	Nd	0	1	391
	***p.V281L**	G	T	YA	Patolojik	0	13	379
	***p.M283V**	A	G	YA	Patolojik	0	1	391
Ekzon 8	***p.Q318X**	C	T	Anlamsız	Patolojik	0	32	360
	***p.R341W**	C	T	YA	Patolojik	0	1	391
	***p.R356W**	C	T	YA	Patolojik	0	4	388
Ekzon 9	p.S374S	C	T	Sessiz	Nd	15	110	267
	p.P386P	C	G	Sessiz	Nd	0	1	391
	***p.P453S**	C	T	YA	Patolojik	0	2	390
Ekzon10	***p.P482S**	C	T	YA	Patolojik	0	3	389
	***p.R483fs**		insC	İlave	Patoloji	0	1	391
	p.P490P	G	A	Sessiz	Nd	50	181	161
	****p.G491S**	G	A	YA	Nd	0	1	391
	p.S493N	G	A	YA	Normal	60	186	146

*patolojik, ** patolojik ve yeni değişimleri göstermek için kullanılmıştır. Nd: Bilinmiyor, YA: Yanlış anlamlı.

Yukarda belirlenen değişimlere ilave olarak gen konversiyonu 5 farklı bireyde belirlenmiş olup, bu konversiyonlar 2 bireyde ekzon 1-8, 2 bireyde ekzon 1-7 ve 1 bireyde ekzon 4-8 arasında meydana gelmiştir (Tablo 4.2). Bir bireyde *CYP21A2* geni PCR yöntemi ile çoğaltılamadığı için bu durum primer bağlanma bölgelerinde meydana gelen homozigot değişim kaynaklı olabileceği gibi kısmı ya da genin tamamının kaybı ya da hibrid gen oluşum olasılığı şeklinde değerlendirilmiş, diğer taraftan aynı hastada *CYP21A2* genin proksimal promotör bölgesinde değişim belirlenmemiştir.

Tablo 4.2. *Gen Konversiyonlarının Kapsadığı Ekzonlar ve Gen Konversiyonu Kaynaklı Meydana Gelen Değişimler.*

Ekzon 1	**Ekzon 3**	**Ekzon 4**	**Ekzon 6**	**Ekzon 7**	**Ekzon 8**	**Ekzon 10**
P30L	G110fs	I172N	I236N/V237E/M239K	L307fs	Q318X	
		I172N	I236N/V237E/M239K	V281L/L307fs	Q318X/R356W	
P30L	G110fs	I172N	I236N/V237E/M239K	V281L/L307fs		
P30L	G110fs	I172N	I236N/V237E/M239K	V281L/L307fs	Q318X/R356W	*G491S

P30L	G110fs	I172N	I236N/V237E/M239K	V281L/L307fs		

*Değişim ilk kez tarafımızdan belirlenmiş olup, *CYP21A1P* kanyaklı olmayıp *de novo* olarak meydana gelmiştir.

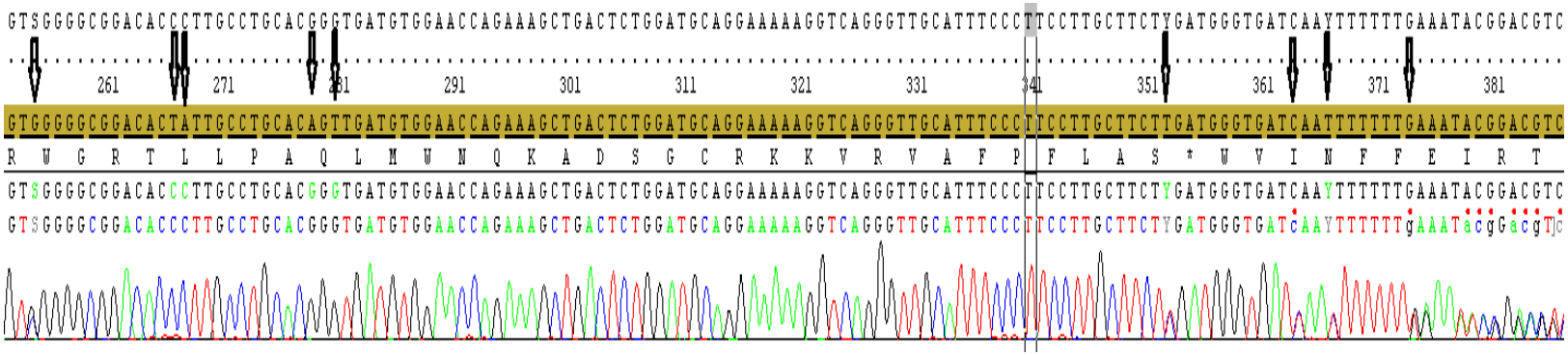
4.2.2. CYP21A2 promotör Bölgesi Değişimleri

Proksimal promotör bölgesi için analiz edilen 392 gönüllüden 50 bireyde 19 farklı promotör değişimi belirlenmiş olup belirlenen değişimler Tablo 4.3'de listelenmiştir. Belirlenen 8 farklı değişim sadece bir baz üzerinde meydana gelen değişimleri ihtiva ederken belirlenen diğer değişimler promotör üzerinde meydana gelen mikro ve makro gen konversiyonlarını kapsamaktadır. Belirlenen değişimlerin 49 tanesi heterozigot formda olup, sadece bir gönüllüde promotör bölgesi üzerinde heterozigot ve homozigot değişimler aynı alleller üzerinde belirlenmiştir (Şekil 4.3). Belirlenen -308. baz üzerinde iki farklı G>C ve G>T değişim belirlenmiştir. G>T değişimi daha önce tanımlanmamış olup ilk kez tarafımızdan belirlenmiştir.

Tablo 4.3. *Belirlenen Proksimal Promotör Değişimleri, Klinik Etkisi ve Birey Sayıları.*

Değişimin İsmi-Lokalizasyonu	Klinik Etki	n
-73 C>T Heterozigot	Nd	1
-120 G>A Heterozigot	Nd	1
-121 C>T Heterozigot	Nd	1
-199 T>C Heterozigot	Nd	1
-284 A>G Heterozigot	Nd	2
-296 T>C Heterozigot	Nd	3
-308 G>T Heterozigot	Nd	5
-308 G>C Heterozigot	Nd	5
-103A>G, -110T>C, -113G>A Heterozigot	Patolojik	2
-103A>G, -110T>C,-113G>A, -126 C>T Heterozigot	Patolojik	1
-196 T>C,-282T>G,-284 A>G,-295 A>C, -296 T>C Heterozigot	Nd	17
-103A>G,-110 T>C,-113 G>A,-196insT,-199 T>C,-210 T>C Heterozigot	Patolojik	1
-103 A>G,-110 T>C,-113 G>A,-126 C>T,-196insT,-196 T>C,-199 T>C,-210 T>C,-308 G>C Heterozigot, -282 T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296T>CHomozigot	Patolojik	1
-196insT,-199 T>C,-210 T>C Heterozigot	Nd	2
-282T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296 T>C Heterozigot	Nd	3
-282T>G,-284 A>G Heterozigot	Nd	1
-103A>G,-110 T>C,-113 G>A,-126 C>T,-196insT,-199 T>C,-210 T>C,-282T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296 T>C,-308G>C Heterozigot	Patolojik	1
-196insT,-199 T>C,-210 T>C,-282T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296 T>C,-308 G>T Heterozigot	Nd	1
-295 A>C,- 296 T>C, -308 G>C Heterozigot	Nd	1

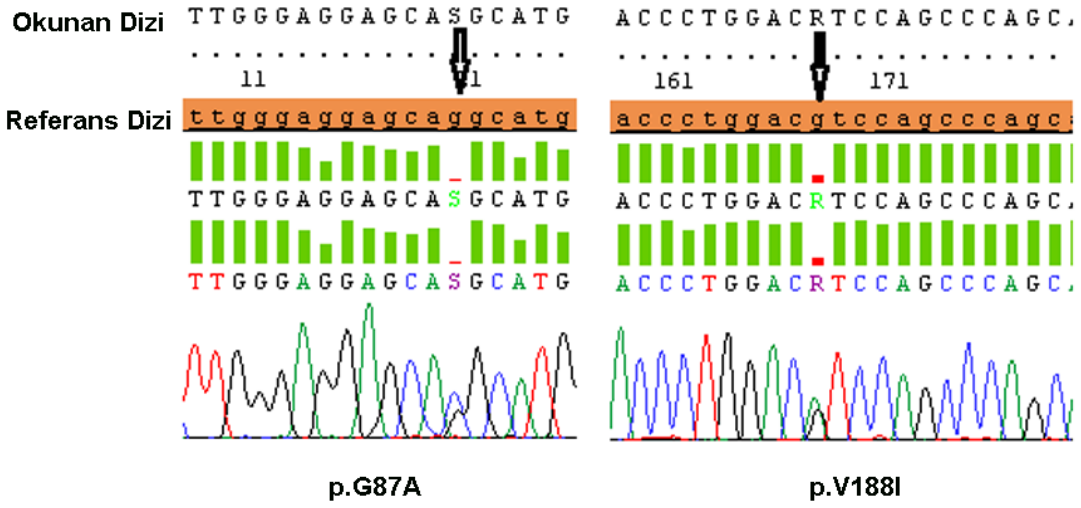
Nd: Bilinmiyor, n: Birey sayısı.



Şekil 4.3. *Promotör Üzerinde Belirlenen Soldan Sağa Sırası ile -308 G>C Heterozigot, -296T>C, -295 A>C, -284 A>G, -282 T>G Homozigot ve -210 T>C, -199 T>C, -196 T>C, -196insT Heterozigot Değişimleri.*

4.2.3. CYP11B1 Geninde Belirlenen Değişimler

CYP11B1 genine ait protein kodlayan bütün bölgeleri ve ekzon-intron bağlantı bölgeleri açısından analiz edilen 392 gönüllüde, sessiz, alternatif kesim bölgesi, yanlış anlamlı olmak üzere 18 farklı değişim belirlenmiş olup, bunların 10 tanesi sessiz, 7 tanesi yanlış anlamlı ve 1 tanesi alternatif kesim bölgesi değişimleridir (Tablo 4.4). Yanlış anlamlı değişimlerinden 2 tanesi (p.G87A ve p.V188I) ilk kez tarafımızdan belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *CYP11B1 Geni Üzerinde Belirlenen p.G87A (c.265 GGC>CGC) ve p.V188I (c.562 GTC>ATC) Değişimlerine Ait Elektrogram Görüntüsü. Değişimin olduğu noktalar ok ile işaretlenmiştir.*

CYP11B1 geni üzerinde belirlenen değişimler ekzon 3 ve 4 üzerinde sessiz değişimler iken ekzon 8 ve 9 üzerinde sessiz değişimler dahi belirlenmemiştir. Ekzon 1, 2, 5, 6 ve 7 üzerinde patolojik değişimlerin yanı sıra sessiz değişimler de belirlenmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. *CYP11B1 Geninde Belirlenen Değişimler ve Sıklığı. Mutasyon grubu, klinik üzerine etkisi tabloda ayrıca belirtilmiştir.*

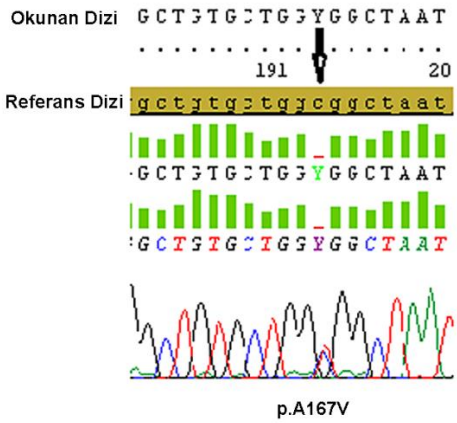
CYP11B1	Değişimin ismi	Referans	Mutant	Mutasyon Grubu	Klinik Etki	Homozigot (n)	Heterozigot (n)	Wt (n)
Ekzon 1	p.L16L	C	T	Sessiz	Nd	0	1	391
	***p.R43Q**	G	A	YA	Patolojik	1	45	346

	p.G46G	C	T	Sessiz	Nd	0	3	389
	***p.D63H**	G	C	YA	Patolojik	0	1	391
	p.L75L	A	G	Sessiz	Nd	171	178	43
Ekzon 2	p.Y81Y	C	T	Sessiz	Nd	0	8	384
	p.D82D	A	T	Sessiz	Nd	102	196	94
	****p.G87A**	G	C	YA	Nd	0	1	391
Ekzon 3	p.R143R	G	A	Sessiz	Nd	0	1	391
	****p.V188I**	G	A	Sessiz	Nd	0	1	391
Ekzon 4	***p.R246H**	G	A	YA	Patolojik	0	1	391
Ekzon 5	p.Y275Y	T	C	Sessiz	Nd	0	1	391
	p.A291A	G	A	Sessiz	Nd	2	32	358
	***p.N335D**	A	G	YA	Patolojik	0	1	391
Ekzon 6	p.L362L	G	C	Sessiz	Nd	1	45	346
	p.R366R	T	G	Sessiz	Nd	0	2	390
	+p.R374R	C	A	Sessiz	Patolojik/ normal	0	11	381
Ekzon 7	**+p.A386V**	C	T	YA	Patolojik/ normal	1	47	344

*patolojik, ** patolojik ve yeni değişimleri, +, patolojik olup olmadığına dair kesin verilerin olmadığı değişimleri göstermek için kullanılmıştır. Nd: Bilinmiyor, n: Birey sayısı, YA: Yanlış anlamlı.

4.2.4. 3βHSD2 Geninde Belirlenen Değişimler

3βHSD2 geninin protein kodlayan bütün bölgeleri ve ekzon-intron bağlantı bölgeleri açısından analiz edilen 392 gönüllüde sadece 2 farklı sessiz ve 1 adet yanlış anlamlı değişimi heterozigot formda belirlenmiş olup, belirlenen değişimlerin tamamı en uzun ekzon olan 4. ekzonda lokalizedir. Ekzon 2 ve ekzon 3 üzerinde herhangi bir değişim belirlenmemiştir (Tablo 4.5). Ekzon 1 protein kodlayan bölgeye dâhil olmadığı için analiz edilmemiştir. Patolojik etkisi olan p.A167V (c.749 GCG>GTG) değişime ait elektrogram görüntüsü Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. *3βHSD2 Genine Ait p. A167V (c.749 GCG>GTG) Değişiminin Elektrogram Görüntüsü. Ok baz değişiminin olduğu noktayı işaretlemek amacı ile kullanılmıştır.*

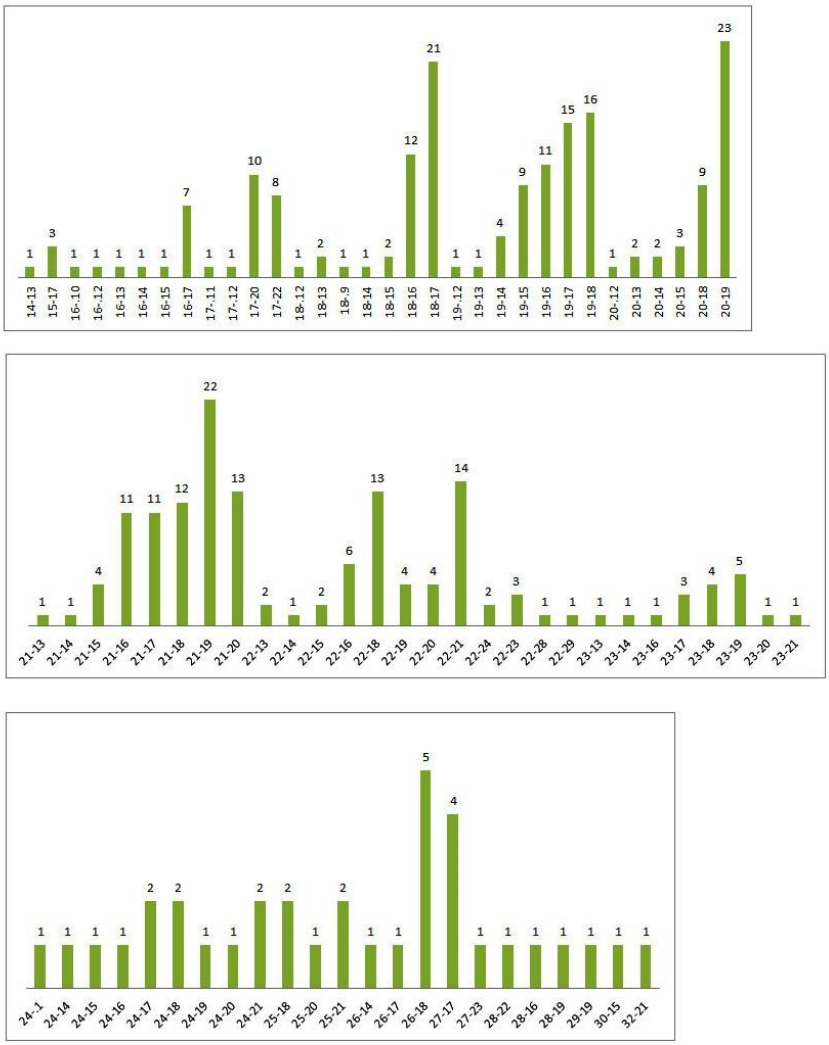
Tablo 4.5. *3βHSD2 Geninde Belirlenen Değişimler ve Sıklığı.*

3βHSD2	Değişimin ismi	Referans	Mutant	Mutasyon Grubu	Klinik Etki	Homozigot (n)	Heterozigot (n)	Wt (n)
Ekzon 2								
Ekzon 3								
Ekzon 4	p.A167V	C	T	YA	Patolojik	0	1	393
	p.R240R	G	A	Sessiz	Nd	0	1	393
	p.T320T	A	C	Sessiz	Nd	0	2	392

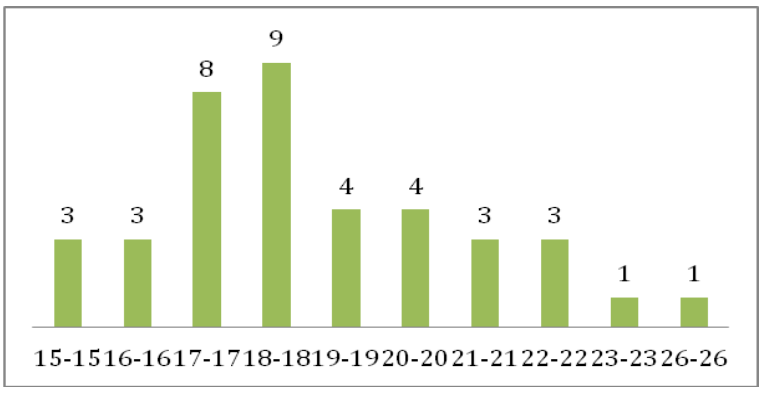
n: Birey sayısı Nd: Bilinmiyor, YA: Yanlış anlamlı.

4.2.5. AR Geninde Belirlenen Değişimler

AR geni ekzon 1 üzerinde lokalize olan poly-Q (CAG) 3'lü tekrar artışı 392 gönüllüde fragman analizi ile belirlenmiştir. 39 gönüllü homozigot, 355 gönüllü heterozigot CAG tekrarı belirlenmiş olup, tekrarlar en az 1 ve en fazla 32 tekrardan oluşmaktadır. 83 farklı heterozigot CAG tekrar kombinasyonu belirlenmiştir. En sık belirlenen heterozigot (Şekil 4.6) tekrar sayısı 23 birey ile 20-19, 22 birey ile 21-19 ve 21 birey ile 18-17 tekrarları olarak belirlnemiştir (Grafik 4.1). Homozigot (Şekil 4.7) 18 CAG tekrarı 9 bireyde belirlenmiştir (Grafik 4.2). Heterozigot ve homozigot tekrar ve birey sayılarının dağılım Grafik 4.1 ve 4.2'de verilmiştir.

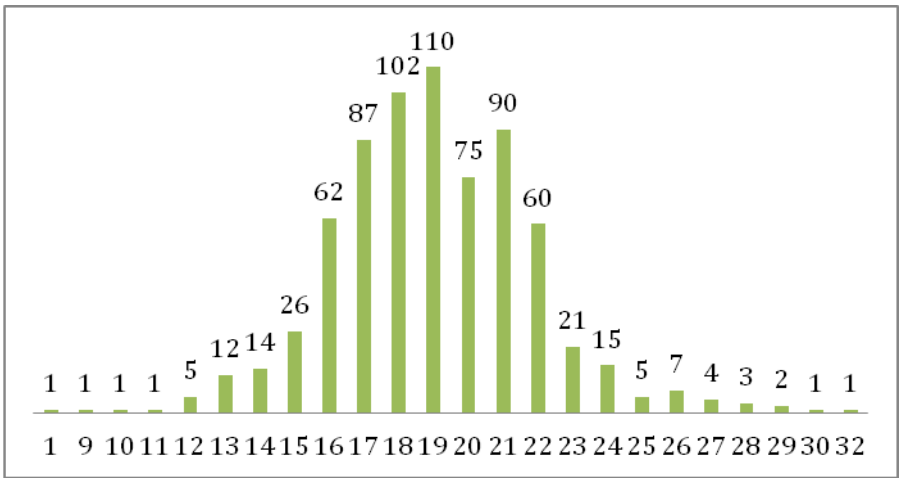


Grafik 4.1. *Heterozigot Olarak Belirlenen CAG Tekrar ve Birey Sayıları. Yatay eksende yer alan rakamlar tekrar sayısını, dikey sütunlar birey sayısını belirtmektedir.*

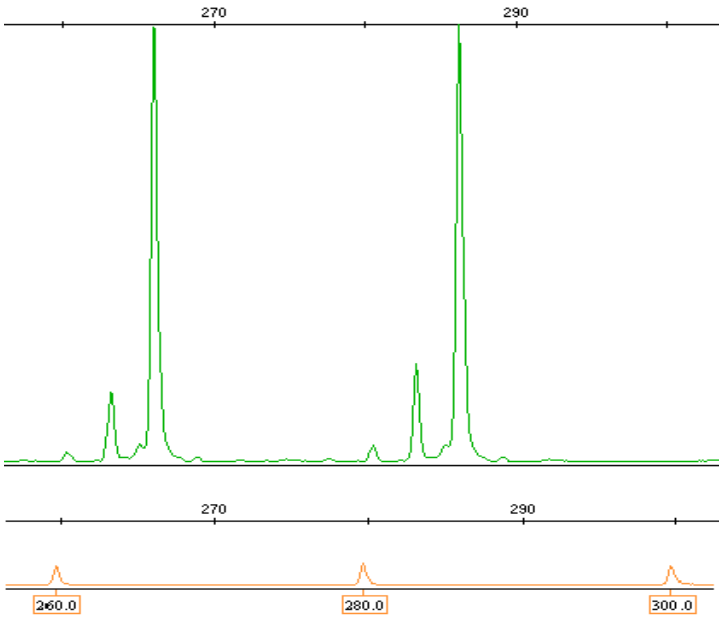


Grafik 4.2. *Homozigot Olarak Belirlenen CAG Tekrar ve Birey Sayıları. Yatay eksen tekrar sayısını, dikey sütunlar birey sayısını belirtmektedir.*

CAG tekrarı bakımından en sık görülen alleler 17, 18, 19, 21 tekrar içeren alleller olarak belirlenmiştir. 392 kadın gönüllü ve 784 (diploid) allelde belirlenen allel sayıları ve CAG tekrarları Grafik 4.3'de belirtilmiştir.

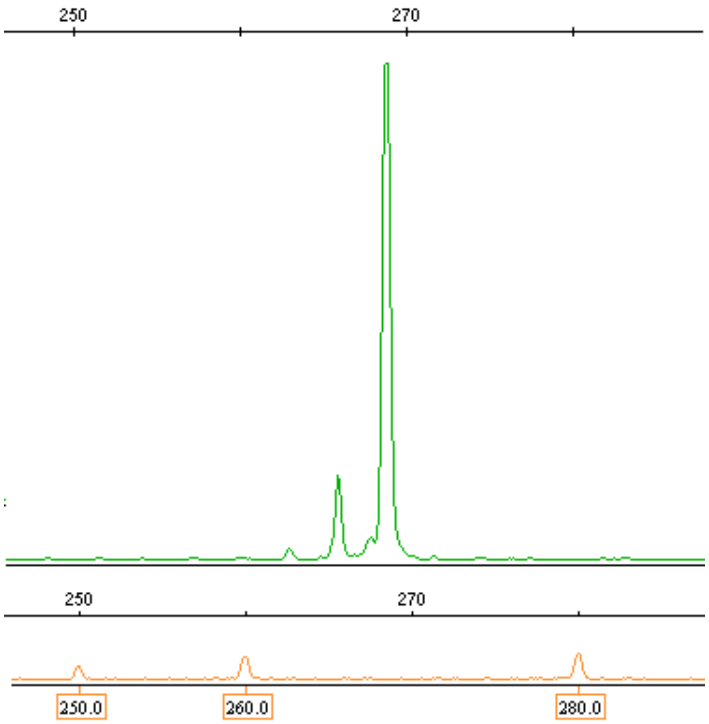


Grafik 4.3. *CAG Tekrar ve Allel Sayıları. Yatay eksen CAG tekrar sayısını, dikey sütunlar allel sayısını belirtmektedir.*



Şekil 4.6. *Heterozigot Olarak Belirlenen Allellerin Genemapper Programı İle Analiz Edildikten Sonraki Fragman Görüntüsü. AR genine ait PCR ürünü kullanılan primerin yeşil floresan ile işaretli olmasından dolayı yeşil, boyut marker ise turuncu fragman olarak gösterilmektedir.*

Soldan sağa birinci fragman 267 bp büyüklüğünde olup 15 CAG tekrarı, ikinci fragman 285bp büyüklüğünde olup 21 CAG tekrarı içermektedir.



Şekil 4.7. *Homozigot Olarak Belirlenen Allelin Genemapper Programı İle Analiz Edildikten Sonraki Fragman Görüntüsü. AR genine ait PCR ürünü kullanılan primerin yeşil floresan ile işaretli olmasından dolayı yeşil, boyut marker ise turuncu fragman olarak gösterilmektedir. Fragman 267 bp büyüklüğünde olup 15 CAG tekrarı içermektedir.*

4.3. Kadın Gönüllülerde CYP11B1, CYP21A2 ve 3βHSD2 Gen Değişimleri ve Tanıları

4.3.1. CYP21A2 Gen Değişimleri ve Hasta Tanıları

Klinik ve moleküler sonuçlarını karşılaştırma imkânı sunmak adına hasta tanıları ve belirlenen değişimler hirsutizm şikâyeti ile Endokrin polikliniğine başvuru yapan 122 kadın ve kan bankasına kan veren ya da verme potansiyeli olan 270 gönüllü kadın olmak üzere iki grup halinde verilmiştir.

4.3.1.1. Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup

Hirsutizm şikâyeti ile gelen grupta 29 bireyde, 8 farklı değişim belirlenmiş olup, p.A89V değişimi hariç tamamı heterozigot formda belirlenmiştir. Klinik ve biyokimyasal veriler ilave olarak ACTH stimülasyon testi ile otozomal resesif olarak kalıtılan 21OH eksikliğine bağlı NKAH tanısı toplam 4 bireyden ikisinde heterozigot

p.V281L değişimi belirlenirken, 1 bireyde p. A89V değişimi homozigot olarak belirlenmiştir. NKAH tanısı alan diğer bireyde 21OH geni açısından normal bulunmuştur. PKOS tanısı alan bir hastada PZR çalışmadığı için genin kısmı ya da tamamının homozigot kaybı olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.6). Belirlenen p.G491S değişimi ekzon 1-8'i kapsayan ve PKOS tanısı alan bireyde birlikte heterozigot olarak belirlenmiştir, fakat bu iki farklı değişimin aynı allel ya da farklı allel üzerinde olup olmadığını belirlemek adına ilave bir moleküler çalışma yapılmadığı ve aile bireylerinden kan alınamadığı için mevcut veri yoktur.

Tablo 4.6. *Hirsutizm Şikâyeti İle Gelen Grupta Belirlenen CYP21A2 Gen Değişimleri ve Klinik Tanıları.*

Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup (n: 122)	**PKOS (n:94)**	**IHA (n:12)**	**IH (n:14)**	**NKAH (n:2)**
Q318X	8	2	3	0
V281L	7	1	0	0
P453S	1	0	0	0
M283V	1	0	0	0
P482S	0	0	0	0
R341W	0	0	0	0
R356W	0	0	0	0
R483fs	0	0	0	0
IVS2-13C>G	0	0	0	0
M187I	1	0	0	0
A89V*	0	0	0	1
Gen Konversiyonu	3	0	0	0
Gen Kaybı	0	0	0	1
Toplam	21	3	3	2

*homozigot değişimi belirtmek için kullanılmıştır. n: Birey (katılımcı) sayısı.

4.3.1.2. Şikâyeti Olmayan Gönüllü Grubu

CYP21A2 geni için taranan grupta 40 tane bireyde 9 farklı değişim belirlenmiş olup tamamı heterozigot formdadır. Değişimlerin tamamı tek heterozigotluk halinde olup birlikte heterozigotluk belirlenmemiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. *Gönüllü Grubunda Belirlenen CYP21A2 Gen Değişimleri ve Klinik Tanıları.*

Gönüllü Grubu (n:270)	**Normal (n:172)**	**PKOS (n:43)**	**IHA (n:12)**	**IH (n:7)**	**İzole Androjen yüksekliği (n:29)**	**NKAH (n:2)**	**OKS (n:5)**
Q318X	12	4	0	1	2	0	0
V281L	5	0	0	0	0	0	0
P453S	0	0	0	0	1	0	0
M283V	0	0	0	0	0	0	0
P482S	2	0	0	1	0	0	0
R341W	0	1	0	0	0	0	0
R356W	4	0	0	0	0	0	0
R483fs	1	0	0	0	0	0	0
IVS2-13 A,C>G	3	1	0	0	0	0	0
M187I	0	0	0	0	0	0	0
A89V*	0	0	0	0	0	0	0
Gen Konversiyonu	1	0	0	0	0	0	1
Gen Kaybı	0	0	0	0	0	0	0
Toplam	28	6	0	2	3	0	1

Çalışma gruplarından bağımsız olarak tanılar ve elde edilen genetik değişimler Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8. *Çalışma Grubunda Belirlenen CYP21A2 Gen Değişimleri ve Klinik Tanıları.*

Çalışma Grubu (n:392)	**Normal (n:172)**	**PKOS (n:137)**	**IHA (n:24)**	**IH (n:21)**	**İzole Androjen yüksekliği (n:29)**	**NKAH (n:4)**	**OKS (n:5)**
Q318X	12	12	2	4	2	0	0
V281L	5	7	1	0	0	0	0
P453S	0	1	0	0	1	0	0
M283V	0	1	0	0	0	0	0
P482S	2	0	0	1	0	0	0
R341W	0	1	0	0	0	0	0
R356W	4	0	0	0	0	0	0
R483fs	1	0	0	0	0	0	0
IVS2-13 A,C>G	3	1	0	0	0	0	0
M187I	0	1	0	0	0	0	0
A89V*	0	0	0	0	0	1	0
Gen Konversiyonu	1	3	0	0	0	0	1
Gen Kaybı	0	0	0	0	0	1	0
Toplam	28	27	3	5	3	2	1

n: Birey (katılımcı) sayısı.

4.3.2. CYP21A2 Promotör Değişimleri ve Hasta Tanıları

Klinik ve moleküler sonuçlarını karşılaştırma imkânı sunmak adına hasta tanıları ve belirlenen değişimler hirsutizm şikâyeti ile Endokrin polikliniğine başvuru yapan 122 kadın ve kan bankasına kan veren ya da verme potansiyeli olan 270 gönüllü kadın olmak üzere iki grup halinde verilmiştir.

4.3.2.1. Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup

CYP21A2 genine ait proksimal promotör açısından analiz edilen 122 bireyde, patolojik olduğuna dair deneysel ya da hasta bazlı çalışma olmayan 3 farklı baz değişimi (-73 C>T, -284 A>G, -308 G>C) ve patolojik olduğu bilinen 4 farklı kompleks değişimlerin tamamı heterozigot formda belirlenmiştir (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. *Hirsutizm Şikâyeti İle Gelen Grupta CYP21A2 Genine Ait Proksimal Promotör Bölgesinde Belirlenen Değişimler.*

Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup (n: 122)	**PKOS (n:94)**	**IHA (n:12)**	**IH (n:14)**	**NKAH (n:2)**
-73 C>T Heterozigot	1	0	0	0
-120 G>A Heterozigot	0	0	0	0
-121 C>T Heterozigot	0	0	0	0
-199 T>C Heterozigot	0	0	0	0
-284 A>G Heterozigot	1	0	0	0
-296 T>C Heterozigot	0	0	0	0
-308 G>T Heterozigot	0	0	0	0
-308 G>C Heterozigot	1	0	1	0
-103A>G, -110T>C, -113G>A Heterozigot	1	0	0	0
-103A>G, -110T>C, -113G>A, -126 C>T Heterozigot	0	0	0	0
-196 T>C,-282T>G,-284 A>G,-295 A>C, -296 T>C Heterozigot	5	0	1	0
-103 A>G,- 110 T>C, -113 G>A,-196insT,-199 T>C,-210 T>C Heterozigot	0	0	0	
-103 A>G,-110 T>C,-113 G>A,-126 C>T,-196insT,-196 T>C,-199 T>C,-210 T>C, -308 G>C Heterozigot,-282 T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296T>C Homozigot	0	0	0	0
196insT,199 T>C,210 T>C Heterozigot	0	0	0	0
-282T>G,-284 A>G,-295 A>C, -296 T>C Heterozigot	2	0	0	0
-282T>G,-284 A>G Heterozigot	0	0	0	0
-103 A>G, -110 T>C, -113 G>A, -126 C>T,-196insT,-199 T>C,-210 T>C, -282T>G,-284 A>G,-295 A>C, -296 T>C, -308 G>C Heterozigot	0	0	0	0
-196insT,-199 T>C,-210 T>C, -282T>G,-284 A>G,-295 A>C, -296 T>C, -308 G>T Heterozigot	0	0	0	0
-295 A>C, -296 T>C,-308 G>C Heterozigot	0	0	0	0
Toplam	11	0	2	0

*homozigot değişimleri göstermek için kullanılmıştır. n: Birey (katılımcı) sayısı.

4.3.2.2. Şikâyeti Olmayan Gönüllü Grubu

CYP21A2 genine ait proksimal promotör açısından analiz edilen 270 bireyde, patolojik olduğuna dair deneysel ya da hasta bazlı çalışma olmayan 7 farklı baz değişimi (-120 G>A, -121 C>T, -199 T>C, -284 A>G, -296 T>C -308 G>C, -308 G>T) ve patolojik olduğu bilinen 10 farklı kompleks değişimlerin tamamı heterozigot formda belirlenmiştir (Tablo 4.10). 10 farklı kompleks değişimin 1 tanesi izole androjen yüksekliği olan bireyde belirlenmiş olup, aynı anda heterozigot ve homozigot değişimleri içermektedir. Bu birey genetik olarak 21OH eksikliği kaynaklı NKAH ile uyumlu olduğu için bu gruba dâhil edilmiştir.

Tablo 4.10. *Gönüllü Grubunda CYP21A2 Genine Ait Proksimal Promotör Bölgesinde Belirlenen Değişimler.*

Gönüllü Grubu (n:270)	**Normal (n:172)**	**PKOS (n:43)**	**IHA (n:12)**	**IH (n:7)**	**İzole Androjen Yüksekliği (n:29)**	**NKAH (n:2)**	**OKS (n:5)**
-73 C>T Heterozigot	0	0	0	0	0	0	0
-120 G>A Heterozigot	0	1	0	0	0	0	0
-121 C>T Heterozigot	0	0	0	0	1	0	0
-199 T>C Heterozigot	0	0	0	0	1	0	0
-284 A>G Heterozigot	1	0	0	0	0	0	0
-296 T>C Heterozigot	2	0	0	1	0	0	0
-308 G>T Heterozigot	4	1	0	0	0	0	0
-308 G>C Heterozigot	2	0	0	0	1	0	0
-103A>G, -110T>C, -113G>A Heterozigot	1	0	0	0	0	0	0
-103A>G, -110T>C, -113G>A, 126 C>T Heterozigot	1	0	0	0	0	0	0
-196 T>C,-282T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296 T>C Heterozigot	7	1	1	1	1	0	0
-103 A>G, -110 T>C, -113 G>A,-196insT,-199 T>C,-210 T>C Heterozigot	0	0	0	0	0	0	0
-103 A>G,-110 T>C,-113 G>A,-126 C>T,-196insT,-196 T>C,-199 T>C,-210 T>C,-308 G>C Heterozigot, *-282 T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296T>C Homozigot	0	0	0	0	0	1	0
-196insT,-199 T>C,-210 T>C Heterozigot	0	0	0	0	2	0	0
-282T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296 T>C Heterozigot	1	0	0	0	0	0	0
-282T>G,-284 A>G Heterozigot	1	0	0	0	0	0	0
-103 A>G, -110 T>C, -113 G>A, -126 C>T,-196insT,-199 T>C,-210 T>C, -282T>G,-284 A>G,-295 A>C, -296 T>C, -308 G>C	0	1	0	0	0	0	0

Heterozigot							
-196insT,-199 T>C,-210 T>C, -282T>G,-284 A>G,-295 A>C, -296 T>C,- 308 G>T Heterozigot	1	0	0	0	0	0	0
-295 A>C,-296 T>C, -308 G>C Heterozigot	1	0	0	0	0	0	0
Toplam	22	4	1	2	6	1	0

*homozigot değişimi göstermek amacı ile kullanılmıştır. n: Birey (katılımcı) sayısı.

Çalışma gruplarından bağımsız olarak tanılar ve elde edilen genetik değişimler Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.11. *Çalışma Grubunda CYP21A2 Genine Ait Proksimal Promotör Bölgesinde Belirlenen Değişimler.*

Çalışma Grubu (n:392)	**Normal (n:172)**	**PKOS (n:137)**	**IHA (n:24)**	**IH (n:21)**	**İzole Androjen Yüksekliği (n:29)**	**NKAH (n:4)**	**OKS (n:5)**
-73 C>T Heterozigot	0	1	0	0	0	0	0
-120 G>A Heterozigot	0	1	0	0	0	0	0
-121 C>T Heterozigot	0	0	0	0	1	0	0
-199 T>C Heterozigot	0	0	0	0	1	0	0
-284 A>G Heterozigot	1	1	0	0	0	0	0
-296 T>C Heterozigot	2	0	0	1	0	0	0
-308 G>T Heterozigot	4	1	0	0	0	0	0
-308 G>C Heterozigot	2	1	0	1	1	0	0
-103A>G, -110T>C, -113G>A Heterozigot	1	1	0	0	0	0	0
-103A>G, -110T>C, -113G>A, -126 C>T Heterozigot	1	0	0	0	0	0	0
-196 T>C,-282T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296 T>C Heterozigot	7	6	1	2	1	0	0
-103 A>G, -110 T>C, -113 G>A,-196insT,-199 T>C,-210 T>C Heterozigot	0	0	0	0	0	0	0
-103 A>G,-110 T>C,-113 G>A,-126 C>T,-196insT,-196 T>C,-199 T>C,-210 T>C,-308 G>C Heterozigot, *-282 T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296T>C Homozigot	0	0	0	0	0	1	0
-196insT,-199 T>C,-210 T>C Heterozigot	0	0	0	0	2	0	0
-282T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296 T>C Heterozigot	1	2	0	0	0	0	0
-282T>G,-284 A>G Heterozigot	1	0	0	0	0	0	0
-103 A>G, -110 T>C, -113 G>A, -126 C>T,-196insT,-199 T>C,-210 T>C, -282T>G,-284 A>G,-295 A>C, -296 T>C, -308 G>C Heterozigot	0	1	0	0	0	0	0
-196insT,-199 T>C,-210 T>C, -282T>G, -284 A>G,-295 A>C, -296 T>C,- 308 G>T Heterozigot	1	0	0	0	0	0	0
-295 A>C,-296 T>C, -308 G>C Heterozigot	1	0	0	0	0	0	0

Toplam	22	15	1	4	6	1	0

*homozigot değişimi göstermek amacı ile kullanılmıştır. n: Birey (katılımcı) sayısı.

4.3.3. *CYP11B1* Gen Değişimleri ve Hasta Tanıları

Klinik ve moleküler sonuçlarını karşılaştırma imkânı sunmak adına hasta tanıları ve belirlenen değişimler hirsutizm şikâyeti ile Endokrin polikliniğine başvuru yapan 122 kadın ve kan bankasına kan veren ya da verme potansiyeli olan 270 gönüllü kadın olmak üzere iki grup halinde verilmiştir.

4.3.3.1. Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup

Patolojik olan 16 adet, 5 farklı değişim (p.R43Q, p.A386V, p.R374R, p.V188I, p.G87A) *CYP11B1* geni için taranan 122 bireyde belirlenmiştir (Tablo 4.12). Belirlenen değişimlerin tamamı heterozigot formda olup, p.R43Q ve p.A386V değişimleri aynı birey üzerinde belirlenmiştir, diğer taraftan bu değişimlerin aynı allel ya da farklı alleller üzerinde olup olmadığına dair ilave bilgiler mevcut olmadığı için bilinmemektedir.

Tablo 4.12. *Hirsutizm Şikâyeti İle Gelen Grupta Belirlenen CYP11B1 Gen Değişimleri ve Klinik Tanıları.*

Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup (n: 122)	**PKOS (n:94)**	**IHA (n:12)**	**IH (n:14)**	**NKAH (n:2)**
R43Q, A386V	10	2	0	0
R43Q, A386V*	0	0	0	0
R374R, R43Q, A386V	0	0	0	0
R374R	1	0	1	0
A386V	0	0	0	0
D63H	0	0	0	0
V188I	0	1	0	0
G87A	1	0	0	0
N335D	0	0	0	0
Toplam	12	3	1	0

* Homozigot değişimi göstermek için kullanılmıştır. n: Birey (katılımcı) sayısı.

4.3.3.2. Şikâyeti Olmayan Gönüllü Grubu

Patolojik olan 46 adet, 6 farklı değişim (p.R43Q, p.A386V, p.R374R, p.D63H, p.N335D, p.R246H) *CYP11B1* geni için taranan 270 bireyde belirlenmiştir (Tablo 4.13). p.R43Q, p.A386V değişimler 32 bireyde birlikte heterozigot formda belirlenmiş olup,

değişimlerin aynı allel ya da farklı alleller üzerinde olduğuna dair ilave bilgiler mevcut değildir. PKOS tanısı alan bir bireye ait allellerde p.R43Q, p.A386V değişimleri homozigot olarak belirlenmiştir. p.R374R, p.R43Q, p.A386V kompleks değişimleri OKS kullanan 2 bireyde heterozigot olarak belirlenmiş olup, değişimlerin aynı ya da farklı alleller üzerinde bulunup bulunmadığına dair ilave veriler mevcut değildir.

Tablo 4.13. *Gönüllü Grubunda Belirlenen CYP11B1 Gen Değişimleri ve Klinik Tanıları.*

Gönüllü Grubu (n: 270)	**Normal (n:172)**	**PKOS (n:43)**	**IHA (n:12)**	**IH (n:7)**	**İzole Androjen Yüksekliği (n:29)**	**NKAH (n:2)**	**OKS (n:5)**
R43Q, A386V	16	9	1	1	3	0	1
***R43Q, A386V**	0	0	0	0	0	1	0
R374R, R43Q, A386V	1	0	0	0	0	0	1
R374R	4	1	0	0	1	0	1
A386V	1	0	0	1	0	0	0
D63H	1	0	0	0	0	0	0
V188I	0	0	0	0	0	0	0
G87A	0	0	0	0	0	0	0
R246H	0	0	1	0	0	0	0
N335D	1	0	0	0	0	0	0
Toplam	24	10	2	2	4	1	2

***homozigot değişimi göstermek için kullanılmıştır. n: Birey (katılımcı) sayısı.

Çalışma gruplarından bağımsız olarak tanılar ve elde edilen genetik değişimler Tablo 4.14'de verilmiştir.

Tablo 4.14. *Çalışma Grubunda Belirlenen CYP11B1 Gen Değişimleri ve Klinik Tanıları.*

Gönüllü Grubu (n: 270)	**Normal (n:172)**	**PKOS (n:137)**	**IHA (n:24)**	**IH (n:21)**	**İzole Androjen Yüksekliği (n:29)**	**NKAH (n:4)**	**OKS (n:5)**
R43Q, A386V	16	19	3	1	3	0	1
***R43Q, A386V**	0	0	0	0	0	1	0
R374R, R43Q, A386V	1	0	0	0	0	0	1
R374R	4	2	0	1	1	0	1
A386V	1	0	0	1	0	0	0
D63H	1	0	0	0	0	0	0
V188I	0	0	1	0	0	0	0
G87A	0	1	0	0	0	0	0

R246H	0	0	1	0	0	0	0
N335D	1	0	0	0	0	0	0
Toplam	24	22	5	3	4	1	2

*****homozigot değişimi göstermek için kullanılmıştır. n: Birey (katılımcı) sayısı.

4.3.4. 3βHSD2 Gen Değişimleri ve Hasta Tanıları

Klinik ve moleküler sonuçlarını karşılaştırma imkânı sunmak adına hasta tanıları ve belirlenen değişimler hirsutizm şikâyeti ile Endokrin polikliniğine başvuru yapan 122 kadın ve kan bankasına kan veren ya da verme potansiyeli olan 270 gönüllü kadın olmak üzere iki grup halinde verilmiştir.

4.3.4.1. Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup

Taranan 122 kadından *3βHSD2* genine ait patolojik olan hiçbir değişim belirlenmemiştir.

4.3.4.2. Şikâyeti Olmayan Gönüllü Grubu

3βHSD2 geni için taranan 270 bireyden sadece 1 tane heterozigot formda patolojik değişim normal olarak tanı alan grupta belirlenmiştir (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. *Gönüllü Grubunda Belirlenen 3βHSD2 Gen Değişimleri ve Klinik Tanıları.*

Gönüllü Grubu (n: 270)	**Normal (n:172)**	**PKOS (n:43)**	**IHA (n:12)**	**IH (n:7)**	**İzole Androjen yüksekliği (n:29)**	**NKAH (n:2)**	**OKS (n:5)**
A167V	1	0	0	0	0	0	0
Toplam	1	0	0	0	0	0	0

n: Birey (katılımcı) sayısı.

4.3.5. Belirlenen Kombine Değişimler ve Hasta Tanıları

Klinik ve moleküler sonuçlarını karşılaştırma imkânı sunmak adına hasta tanıları ve belirlenen değişimler hirsutizm şikâyeti ile Endokrin polikliniğine başvuru yapan 122 kadın ve kan bankasına kan veren ya da verme potansiyeli olan 270 gönüllü kadın olmak üzere iki grup halinde verilmiştir.

4.3.5.1. Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup

Hirsutizm şikayeti ile gelen 122 kadın hastada taranan *CYP11B1, CYP21A2, 3βHSD2,* ve *CYP21A2*'ye ait proksimal promotör bölgelerinde 9 farklı kombinasyondan oluşan değişim belirlenmiştir (Tablo 4.16). Bu değişimlerde özellikle CYP21A2 ve CYP21A2'ye ait promotör değişimlerinin aynı allel ya da farklı allel üzerinde olmasının belirlenmesi hastaya konulacak PKOS tanısının NKAH olarak değişmesine neden olacaktır, fakat bunun belirlenmesi için gerekli olan analizler yapılamadığı için PKOS tanısı altında verilmiştir.

Tablo 4.16. *Hirsutizm Grubunda Belirlenen Kombine Değişimler ve Hasta Tanıları.*

Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup (n: 122)			
CYP21A2	**CYP11B1**	**Promotör**	**Klinik Tanı**
Q318X	R43Q,A386V		PKOS
Q318X		-282T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296 T>C	PKOS
Q318X	R374R		IHA
Q318X	R43Q,A386V		PKOS
V281L		-196 T>C,-282T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296 T>C	PKOS
*A89V		-103 A>G,-110 T>C,-113 G>A,-196insT,-199 T>C,-210 T>C	NKAH
Ekzon 1-8 GK/G491S			PKOS
Ekzon 1-7 GK	R43Q,A386V		PKOS
	R43Q,A386V	-196 T>C,-282T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296 T>C	PKOS

*Homozigot değişimleri göstermek için kullanılmıştır. GK: Gen Konversiyonu.

4.3.5.2. Şikâyeti Olmayan Gönüllü Grubu

Taranan 270 kadında taranan *CYP11B1, CYP21A2, 3βHSD2,* ve *CYP21A2*'ye ait proksimal promotör bölgelerinde 22 farklı kombinasyondan oluşan değişim belirlenmiştir (Tablo 4.17). Bu değişimlerde özellikle CYP21A2 ve CYP21A2'ye ait promotör değişimlerinin aynı allel ya da farklı allel üzerinde olmasının belirlenmesi hastaya konulacak PKOS tanısının NKAH olarak değişmesine neden olacaktır, fakat bunun belirlenmesi için gerekli olan analizler yapılamadığı için PKOS tanısı altında verilmiştir.

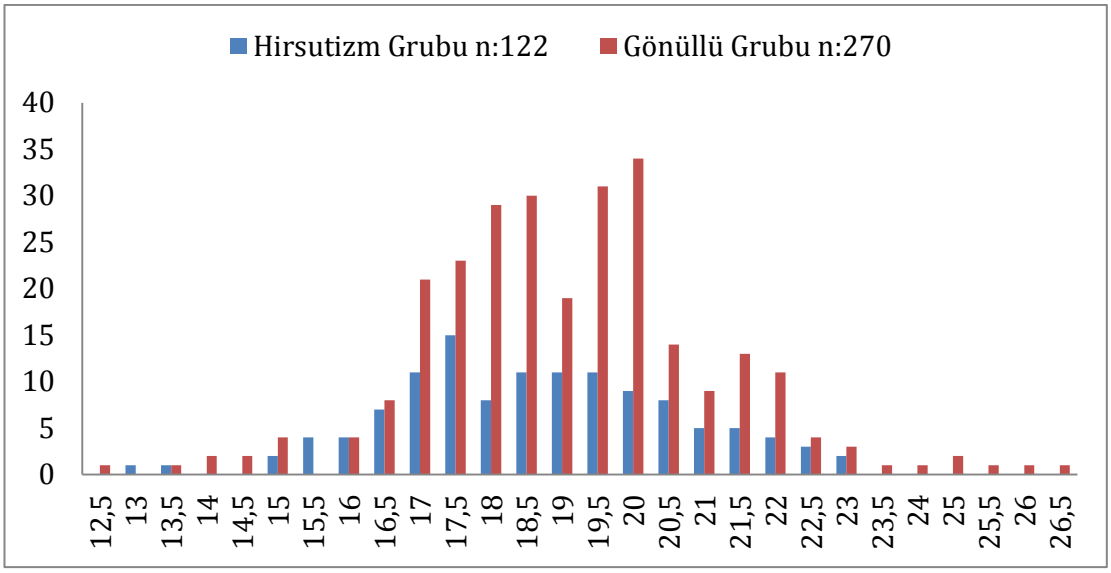
Tablo 4.17. *Gönüllü Grubunda Belirlenen Kombine Değişimler ve Hasta Tanıları.*

Gönüllü Grubu (n: 270)			
CYP21A2	**CYP11B1**	**Promotör**	**Klinik Tanı**
Q318X	R43Q, A386V	-	Normal (n:1)
Q318X	-	-196insT,-199 T>C,-210 T>C, -282T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296 T>C, -308 G>T	PKOS (n:1)
Q318X	R374R	-	PKOS (n:1)
R341W	R43Q, A386V	-196 T>C,-282T>G,-284 A>G,-295 A>C, -296 T>C	PKOS (n:1)
R483fs	R43Q, A386V	-	Normal (n:1)
V281L	R374R, R43Q, A386V	-	Normal (n:1)
P482S	-	-296 T>C	Normal (n:1)
P482S	-	-296 T>C	Normal (n:1)
P482S	-	-296 T>C	IH (n:1)
IVS2-13C>G	R43Q, A386V	-	PKOS (n:1)
IVS2-13C>G	R43Q, A386V	-	Normal (n:1)
IVS2-13C>G	R43Q, A386V	-	Normal (n:1)
*D183E	-	-103 A>G,-110 T>C,-113 G>A,-126 C>T,-196insT,-199 T>C,-210 T>C,-282T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296 T>C,-308 G>C	PKOS (n:1)
	A386V	-196 T>C,-282T>G,-284 A>G,-295 A>C, -296 T>C	IH (n:1)
	R43Q, A386V	-121 C>T	İzole androjen yüksekliği (n:1)
	R374R	-282T>G,-284 A>G	Normal (n:1)
	R43Q, A386V	-103A>G, -110T>C, -113G>A, -126 C>T	Normal (n:1)
	R43Q, A386V	-196 T>C,-282T>G,-284 A>G,-295 A>C, -296 T>C	Normal (n:1)
	R43Q, A386V	-120 G>A HET	PKOS (n:1)
	R374R	-196 T>C,-282T>G,-284 A>G,-295 A>C, -296 T>C	Normal (n:1)
	R374R, R43Q, A386V		OKS (n:1)
	R374R, R43Q, A386V	-	Normal(n:1)
	R43Q, A386V		Normal (n:12)
	*R43Q, A386V		PKOS (n:1)
	R43Q, A386V		İzole Androjen yüksekliği (n:2)
	R43Q, A386V		IHA (n:1)
	R43Q, A386V		IH (n:1)
	R43Q, A386V		PKOS (n:7)
	R43Q, A386V		OKS (n:1)

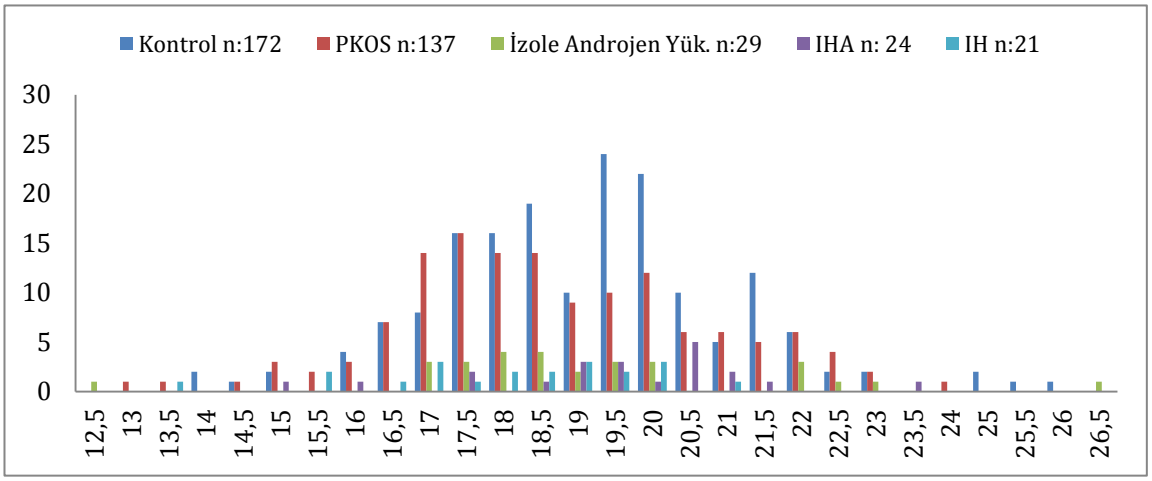
*homozigot değişimleri göstermek için kullanılmıştır. p.D183E değişimi literatürde normalin varyantı olmasına ve 21OH kaynaklı anomalilerle ilişkilendirilmemesine rağmen bizim yaptığımız çalışmada *CYP21A2* genine ait promotör polimorfizmi ile kombine olan homozigot formunun PKOS tanısı alan bireyde belirlenmesinden dolayı tabloda yer verilmiştir.

4.4. Çalışma Grubunda Belirlenen PoliQ Biallelik Değerleri ve Hasta Tanıları

Bu çalışmada, hesaplanan biallelik değerler bu kısımda sunulmuştur. Verilerin sunumunda çalışmaya katılan hirsutizm ve gönüllü grubu (Grafik 4.4)'nun biallelik değerlerine ilave olarak, çalışmaya katılan grubun klinik tanılarına ait biallelik değerleri (Grafik 4.5)'de ayrı ayrı verilmiştir.



Grafik 4.4. *Çalışma Gruplarına Ait PoliQ Biallelik Değerlerine Ait Veriler. Yatay eksen CAG biallelik değeri, dikey eksen belirlenen birey sayısını göstermektedir.*



Grafik 4.5. *Çalışma Gruplarını Oluşturan Tanılara Ait PoliQ Biallelik Değerlerine Ait Veriler. Yatay eksen CAG biallelik değerini, dikey eksen belirlenen birey sayısını göstermektedir.*

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, hirsutizm, kellik, akne veya oligomenore gibi şikâyeti olan 122 kadına ilave olarak hiçbir klinik şikâyeti olmayan kan bankasına kan veren ya da verme potansiyeli olan premenapozal 18-45 yaş arası 270 kadın katılımcıya ait iki grup PKOS, IH, IHA ve NKAH yönünden klinik olarak değerlendirilmelerine ilave olarak *CYP21A2, CYP11B1, 3BHSD2* ve *AR* bakımından genotiplendirilmiştir. Belirlenen hastalıkların tartışılmasının yanı sıra herbir genetik değişim hastalıklardan bağımsız olarak ihtiva ettiği ve patolojik olma özelliği açısından tartışılmış, klinik tanıları ve hirsutizm/hiperandrojenemi bulguları ile sahip oldukları genotip bakımından ilişkilendirilmiş, normal popülasyon ve hirsutizm şikayeti ile gelen gruplarda NKAH sıklığı belirlenmiş, ilave olarak çalışma grubu, tanıları, FGS (Ferriman-Gallwey skor) değeri ve total testosteron seviyeleri ile AR gen polimorfizminin bağlantısının varlığı ele alınmıştır.

5.1. Hasta Tanıları

5.1.1. Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup Tanıları

Bu çalışmaya hirsutizm ve/veya kellik ve/veya akne ve/veya oligomenore gibi şikâyeti olan 122 kadın katılımcının tamamı premenapozal ve 18-45 yaş arasındadır.

Hirsutizm şikayeti ile Endrokrin polikliniğine gelen 122 premenopozal hastandan 94 birey PKOS (%77), 12 birey IHA (%9.8), 14 birey IH (%11.4) ve 2 birey NKAH (%1.6) tanısı almıştır.

PKOS tanısının konulmasında hormonal veriler ve klinik bulguların yanı sıra over ultrasonu da dâhil edilmiştir. Sadece 8 hastanın ultrason verisi olmadığı için tanıya dahil edilememiş fakat ovulasyon durumu göz önüne alınmıştır. Tanı kriterlerinde oligo/anovulasyon ve/veya USG PKO görüntüsüne sahip olmak, klinik hiperandrojenizim ve/veya biyokimyasal hiperandrojenemia'nin yer aldığı Androgen Excess-PKOS Society (AE-PCOS) derneğinin 2009'a ait en son tanı kriterleri kullanılmıştır (Tablo 3.3) (510).

Bu çalışmada, 94 birey ile PKOS sıklığı %77 olarak belirlenmiştir. Hafif hirsutizm şikayeti (FGS 8-15) ile gelen ve başka klinik bulgu ve şikayeti olmayan 152 kadın hasta ile İtalya'da yapılan benzer bir çalışmada Androgen Excess Society (AES)'e göre PKOS sıklığı 72 birey ile %42 olarak belirlenmiştir (511). Türk kadın popülasyonunda yapılan benzer bir çalışmada hirsutizm şikayeti ile gelen 105 kadın hastada Rotterdam'a göre PKOS sıklığı 83 birey ile %79 olarak belirlemiştir (512). Androjen fazlalığı bulguları ile ilişkili şikayetleri olan grup ile İngiltere populasyonunda yapılan çalışmada 873 kadın hastada PKOS sıklığı %82 olarak belirlenmiştir (443).

Diğer bir grup olan IH olup normal androjen seviyelerinde, düzenli ovulasyon ve normal over görünümüne sahip hastalarda ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada IH sıklığı, 14 birey ile %11.4 olarak belirlenmiştir. 588 hirsut kadın katılımcı ile İtalya'da yapılan değerlendirmede IH sıklığı 36 birey ile %6 olarak belirlenmiştir (513). Türk kadın popülasyonunda yapılan benzer bir çalışmada hirsutizm şikayeti ile gelen 105 kadın hastada idiyopatik hirsutizm sıklığı 14 birey ile %13 olarak belirlenmiştir (512). Androjen fazlalığı bulguları ile ilişkili şikayetleri olan grup ile İngiltere popülasyonunda yapılan çalışmada 873 kadın hasta idiyopatik hirsutizm sıklığı %4.7 olarak belirlenmiştir (443).

IHA olarak tanımladığımız diğer bir grup, androjen fazlalığı ile karakterize fakat düzenli ovulasyon döngüsüne ve normal over görünümüne sahip kadın hastalarda belirlenmiş olup, bu çalışmada IHA sıklığı 12 birey %9.8 olarak belirlenmiştir. Türk kadın popülasyonunda yapılan benzer bir çalışmada hirsutizm şikayeti ile gelen 105 kadın hastada idiyopatik hiperandrojenemi sıklığı 6 birey ile %6 olarak belirlenmiştir (512). Androjen fazlalığı bulguları ile ilişkili şikayetleri olan grup ile İngiltere popülasyonunda yapılan çalışmada 873 kadın hasta idiyopatik hiperandrojenemi (artan

androjen seviyesi, hirsutizm, normal ovulasyon) sıklığı 59 kadın aile %6.75 olarak belirlenmiştir (443).

NKAH kısmı 21OH ya da 11OH eksikliği kaynaklı olup, klasik tiplerin gösterdiği ağır klinikleri sergilemez. Etkilenen kız çocuklarında PP ve akne ile kendini gösterebilir. Daha sonraki yıllarda yetişkin kadınlarda hirsutizm, oligomenore veya amonera, alopesi ve subfertilite gözlenebilir. Bu kliniklerin ortaya çıkmasında oldukça fazla bireysel farklılıklar mevcut olup, bazılarında hirsutizm veya oligomenore olmaz iken rastlantısal olarak tanı alabilirler. Bireysel genetik ve çevresel faktörlerin farklı fenotiplerin gelişmesine neden olma ihtimali de oldukça yüksektir. NKAH'ın klinik bulguları PKOS ve/veya IHA ile oldukça benzer olup ayrımı net olarak klinik bulgular ile mümkün olmamaktadır (514). Bu çalışmada, NKAH sıklığı 21OH kaynaklı olarak 2 birey ile %1.6 olarak belirlenmiştir. Bu sıklığın belirlenmesinde ACTH stimülasyon gibi aktif testler değil moleküler yöntemler kullanılmıştır. Türk kadın popülasyonunda yapılan benzer çalışmada hirsutizm şikayeti olan grupta 21OH kaynaklı NKAH sıklığı 285 hastadan 6 kişi ile %2.1 olarak belirlenmiştir (515). Çek cumhuriyeti popülasyonunda 298 hiperandrojenik grup ile yapılan çalışmada moleküler yöntemler haricinde sadece sinakten uyarı testi ile 8 kişi ile %2.7 olarak 21OH'a bağlı NKAH belirlenmiştir (516). Benzer bir çalışmada hirsutizm şikâyeti ile gelen grupta ACTH stimülasyon testine olan cevaba göre 21OH eksikliğine bağlı NKAH sıklığı 105 hastadan 5 birey tanı konulmuş fakat yapılan genetik analiz sonucu sadece 2 hastanın *CYP21A2* bakımından heterozigot (p.P453S ve p.Q318X) olduğu belirlenmiş ve NKAH sıklığı %2 olarak belirlenmiştir (512). Yaygın olarak kullanılan ACTH testinin yalnız pozitif sonuç verme olasılığı söz konusu olup (517, 518), NKAH tanısı için moleküler yöntemler tavsiye edilmektedir (515).

5.1.2. Şikâyeti Olmayan Gönüllü Grup Tanıları

Klinik şikâyeti olmayan kan bankasına kan veren ya da verme potansiyeli olan 270 kadın katılımcının tamamı premenapozal ve 18-45 yaş arasındadır.

Normal popülasyondan çalışmaya katılan 270 premenapozal kadından, 172 tanesi normal (%63.7), 43 tanesi PKOS (%15.9), 12 tanesi IHA (%4.4), 7 tanesi IH (%2.6) ve 29 tanesi izole androjen yüksekliği (%10.7), 2 tanesi NKAH (%0.7) tanısı almıştır. OKS kullanımında olan 5 birey (%1.8) OKS grubu olarak adlandırılmıştır.

Bu çalışmaya normal popülasyondan rastgele örneklem yapıldığı ve over ultrasonu gönüllülük esasına dayandığı için her bireye uygulanamamıştır. Tanı kriterlerinde oligo/anovulasyon ve/veya USG pkos görüntüsüne sahip olmak, klinik hiperandrojenizim ve/veya biyokimyasal hiperandrojenemia'nin yer aldığı AE-PCOS derneğinin 2009'a ait en son tanı kriterleri kullanılmıştır (510).

Yukarıdaki açıklamalar doğrultusunda, 270 katılımcıdan oluşan normal popülasyonda AE-PKOS kriterlerine göre belirlediğimiz PKOS sıklığı 43 birey ile %15.9 olarak belirlenmiş olup, 22 tanesinin (%51.2) klinik muayinesinde hirsutizm belirlenmiştir. PKOS tanısı alan Avrupa ve Amerikalı kadınlarda hirsutizm sıklığı %40-92 olarak belirlenmiştir (519-521). Hirsutizme koyu tenli olan popülasyonlarda daha fazla rastlanırken, açık tenli olan ve doğulu kadınların ergenlik dönemlerinde daha az rastlanmaktadır (yaklaşık %30) (522, 523).

Normal popülasyon kullanılarak yapılan farklı çalışmalarda PKOS sıklığı, ABD popülasyonunda NIH'e göre %4 (524), Avrupa kökenli Kafkas popülasyonunda %6.5 (525), İran popülasyonunda NIH'e göre %7.1 aynı popülasyonda değer Rotterdam'a göre %14.6 (526), Filistin popülasyonunda NIH'e göre %7.3 (527), Türk kadın popülasyonunda yapılan çalışmada ise PKOS sıklığı ise NIH, Rotterdam ve AES'e göre sırası ile %6.1, %19.9, %15.3 olarak belirlenmiştir (528). Güney Avusturalyada yapılan çalışmada 728 gönüllünün katıldığı çalışmada PKOS sıklığı NIH kritelerine göre %8.7, Rotterdam'a göre %11.9 ve AES'e göre %10.2 olarak belirlenmiştir (529). PKOS için konulan kesin ve yaygın kabul edilen tanı kriterlerinin mevcut olmamasının (525) yanı sıra menstrual düzensizlik, FGS için alınan sınır değerlerinin yapılan çalışma ve popülasyondan popülasyona göre farklılık göstermesi (524, 530) yapılan çalışmalar ve popülasyonlar arasındaki farklılığın temel nedenini oluşturmaktadır. Her ne kadar veriler kullanılan yöntem ve popülasyona göre farklılık göstersede çalışmaların ortak noktası PKOS'un reprodüktif dönemde kadınlarda belirlenen en yaygın endokrin bozukluklardan birisi olduğudur.

Bu çalışmada normal popülasyondaki IHA sıklığı 12 birey ile %4.4 olarak belirlenmiştir. IHA'ya dair yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olup (531-533) IHA'yı PKOS'un bir alt grubu olarak tanımlayan yayının (534) yanısıra PKOS tanısını için gerekli oligoovulasyon/anovulasyon ve polikistik over görüntüsü gibi gerekli kriterleri karşılamadığı için bu görüşü benimsemeyen yayında mevcut olup, IHA nedeninin

adrenalin artan aktivitesine bağlı olduğu düşünülmektedir (533). Normal popülasyonda IHA sıklığına dair yapılan çalışma literatürde mevcut olmadığı için mukayese yapma imkânı bulunamamıştır.

Bu çalışmada 7 birey ile IH sıklığı %2.6 olarak belirlenmiştir. Rastgele şeçilen örneklem ile 1126 gönüllü ile yapılan benzer çalışmada İran'da belirlenen IH sıklığı %10.9 iken (526), aynı grup tarafından 1002 gönüllü ile yapılan çalışmada %13 olarak belirlenmiştir (535).

İzole androjen yüksekliği, biyokimyasal hiperandrojenizm olarak tanımlanmakta ve klinik hiperandrojenizm bulgusu olmayan, normal over ya da mestrual döngüye sahip olan fakat yüksek total testosteron, DHEAS ya da androstenedion gibi androjenlerden herhangi birine sahip olan gönüllüler bu gruba dâhil edilmiştir. Bu çalışmada izole androjen yüksekliği oranı 29 birey ile %10.7 olarak belirlenmiştir. Literatürde normal popülasyonda izole androjen yüksekliği ve görülme sıklığına dair yapılan çalışmaya rastlanmadığı için mukayese yapılamamıştır.

Bu çalışmada OKS kullanananların yüzdesi 5 birey ile %1.8 olarak belirlenmiş ve bu grupda biyokimyasal ve klinik bulgularının genotip ile mukayesesi kullanılan OKS'nin biyokimyasal ve klinik bulgular üzerine etkisinden dolayı yapılamamıştır (536).

Bu çalışmada NKAH sıklığı 2 birey ile %0.7olarak belirlenmiştir. 2 bireyden bir tanesi 11OH eksikliği, diğeri ise 21OH eksikliğine bağlı NKAH tanısı almıştır.

5.2. Kadın Gönüllülerde *CYP11B1, CYP21A2* ve *3βHSD2* Genlerinde Belirlenen Değişimlerin Özellikleri ve Klinik Bulgular Üzerine Olan Etkileri

Çalışmanın amaçları arasında, Türk kadın popülasyonuna özgü, aday genlerde meydana gelen patolojik değişimlerin yanısıra en yaygın olanı (founder effect) belirlemek yer almaktadır. Buna ilave olarak bu kısımda patolojik olan değişimlerinn sahip oldukları özellikler mevcut literatür doğrultusunda açıklanmış ve değişimin istatistiki olarak hastaların FGS, oligomenore ya da total testosteron seviyeleri ile ilişkili olup olmadıklarına yer verilmiştir.

5.2.1 *CYP21A2* Geninde Belirlenen Değişimler

Mevcut bilinen 160 nokta değişimi, 16 alternatif kesim bölgesi, 1 düzenleyi bölge (promotör), 18 küçük gen bölgesi kayıpları, 12 küçük gen bölgesi ilaveleri, 3 küçük

ilave ve delesyonlar, 12 tam gen kayıpları, 3 tam gen ilavesi ve 25 kompleks değişim HGMD'nin resmi internet adresinde yer almaktadır (537) (Tablo 5.1).

Bu çalışmada, 29 farklı değişim ekzon 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 ekzonlar üzerinde belirlenmiştir. Ekzon 4 üzerinde değişim belirlenmemiştir. Meydana gelen değişimlerinin 12 tanesi sessiz, 1 tanesi alternatif kesim değişimi, 7 tanesi protein fonksiyonu üzerine etki eden yanlış anlamlı ve 1 tanesi baz ilave mutasyonu, 5 tanesi ise yanlış anlamlı ve ilave değişimleri olmasına rağmen protein fonksiyonu üzerine olumsuz etkisi belirlenmemiş olan grup oluşturmaktadır. 3 adet yanlış anlamlı mutasyonu daha önce belirlenmemiş olup ilk kez tarafımızdan belirlenmiştir. Ekzon 1 üzerinde belirlenen değişimlerin tamamı sessiz olup, yanlış anlamlı grubuna dâhil olan 1 değişim ile en az değişim ekzon 2 üzerinde belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Gen konversiyonu 5 farklı bireyde belirlenmiş olup, bu konversiyonlar 2 bireyde ekzon 1-8, 2 bireyde ekzon 1-7 ve 1 bireyde ekzon 4-8 arasında meydana gelmiştir (Tablo 4.2). Bir bireyde *CYP21A2* geni PZR yöntemi ile çoğaltılamadığı için bu durum primer bağlanma bölgelerinde meydana gelen homozigot değişim kaynaklı olabileceği gibi kısmi ya da genin tamamının kaybı ya da hibrid gen oluşum olasılığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Tanılarından bağımsız olarak çalışmaya katılan 392 gönüllüde 68 heterozigotluk tespit edilmiş olup, *CYP21A2* genine ait Türk kadın popülasyonunda belirlenen patolojik allel taşıyıcılık (heterozigotluk) sıklığı %17.3 olarak belirlenmiştir. Sıklığın bu denli yüksek olmasının nedenleri arasında yüksek akraba evliliğine ilave olarak (538), *CYP21A1P* ile aktif gen arasında meydana gelen mikro ya da makro gen konversiyonları neden gösterilebilir. Promotör bölgesinde ise toplamda 49 heterozigot değişim ile promotör heterozigotluk yüzdesi %12.5 olarak belirlenmiştir.

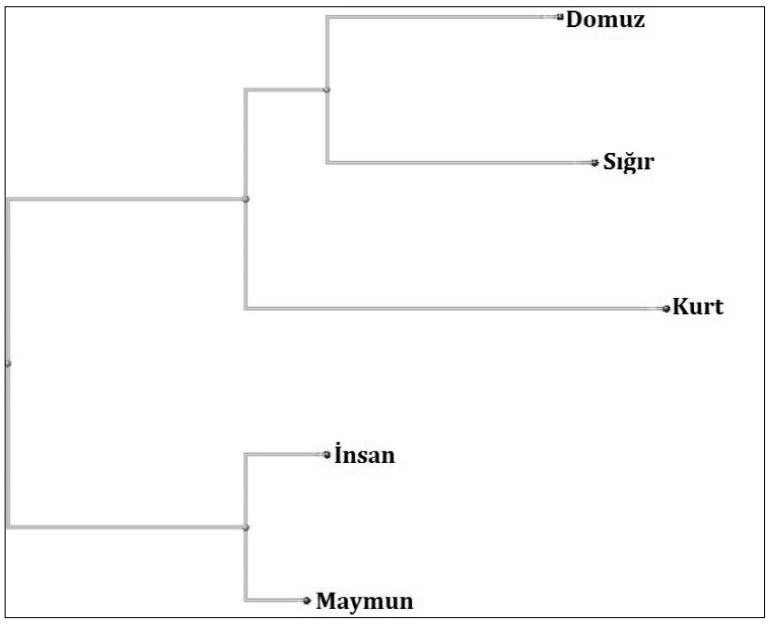
p.V281L, p.Q318X ve promotör değişimleri en fazla belirlenen değişimlerdir. p.Q318X değişiminin *CYP21A2* duplikasyonuna bağlı olarak patolojik olmama özelliğinden dolayı (detay için kısım 5.2.1.2), p.Q318X değişiminin Türk kadın popülasyonundaki yaygınlığından ziyada *CYP21A2* duplikasyonunun sıklığı vurgulanmalıdır.

Sadece p.V281L, p.Q318X, normalin varyantı ve promotör değişimleri olarak adlandırılan değişimler, çalışma grupları (hirsutizm ve gönüllü grubu), klinik tanıları (PKOS, IH, IHA vb), oligomenore ve total testosteron seviyeleri ve FG skorları ile istatistiki açıdan anlamlı olup olmadıkları karşılaştırılmıştır. Belirlenen farklı patolojik

değişimler istatistiki analize tabi tutulacak sayıda belirlenmediği için bu bakımdan değerlendirilmeye tabi tutulamamıştır.

5.2.1.1. Yanlış Anlamlı Değişimler

p.A89V değişimi, *CYP21A2* genine ait ekzon 2 üzerinde, c.266'ıncı bazında, 89. kodonunda yer almakta ve GCT>GTT değişimine neden olmaktadır. Bu çalışmada 1 bireyde homozigot olarak belirlenemiş olup, amino asit düzeyinde GCT tarafından kodlanan alanin amino asitin valine dönüşümüne neden olmaktadır. Hidrofobik olan alanin yine hidrofobik olan valin amino asitine dönüşmüştür. Bu değişim tarafımızdan ilk kez belirlenmiş olup, 89. amino asitde yer alan alanin amino asiti insan ve maymun gibi filogenetik açıdan (Şekil 5.1) birbirine nisbeten daha yakın türlerde olduğu gibi sığır, domuz ve kurt gibi nisbeten filogenetik olarak farklı türlerde korunmuştur (Şekil 5.2).



Şekil 5.1. *Bazı Türlerin CYP21A2 Proteini Açısından Yakınlıklarını Göstermek Amacı İle Oluşturulan Filogenetik Ağaç. Filogenetik ağacın oluşturulmasında türlere ait protein dizileri kullanılmıştır.*



Şekil 5.2. *p.A89V Noktası İçin Farklı Türlerde CYP21A2 Proteinine Ait Dizilerin Karşılaştırması. p.A89V noktası dikdörtgen içerisine alınarak vurgulanmıştır.*

Daha önce tanımlanmış olan p.G90V değişimi, R91'in bitişiğinde B-B′ loop'da yer almakta, G90'da meydana gelen değişim glisinin valine dönüşümüne neden olarak glisinin B-B′ loop'a sağladığı esnekliğin kaybına neden olarak R91'in substrat bağlanma bölgesi ile olan hidrojen bağlanma yeteneğini olumsuz etkileyerek tuz kaybettiren KAH'a neden olmaktadır (539). Bizim belirlediğimiz A89V değişimi hirsutizm şikayeti ile gelen ve yapılan ACTH stimülasyon testi doğrultusunda NKAH tanısı alan bir hastada belirlenmiş olup, R91 amino asitinin fonksiyonu üzerine p.G90V kadar olumsuz etkisi olmadığı görülmektedir. Diğer taraftan alanin ve valinin hidrofobik gruba dâhil olmasıda değişimin protein fonksiyonu üzerine olan etkisinin tolere edilmesinde etkili olabileceği veya olumsuz etkisini azaltan bir diğer unsur olabileceği düşünülmektedir.

Hirsutizm şikayeti ile Erciyes Üniversitesi, Endokrin polikliğine başvuran ve NKAH tanısı alan 18 yaşındaki hastanın klinik bulguları; total testosteron: 141 ng/dl (referans aralığı 11-80), serbest testosteron 2.76 ng/dl (referans aralığı 1-2.5), SHBG 30 nmol/L (referans aralığı 32-100), DHEAS 2885ng/ml (referans aralığı 1330-4410), andorstenedion 2.82 ng/ml (referans aralığı 0.1-3.08), over polikistik, FGS: 17, adetler düzenli olan vakada ACTH stimülasyon testinde en yüksek 17OHP değeri 60. dk'da: 11.38 ng/ml olarak belirlenmiş olup 21OHD kaynaklı NKAH ile uyumludur. Yapılan *CYP21A2* genetik analizinde 2. ekzonda lokalize p.A89V homozigot değişimini belirlenmiştir.

p.M187I *CYP21A2* geninin 5. ekzonunun c.561'inci bazının 187. kodonunda yer alan ATG>ATA değişimi 1 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. p.M187I değişimi, daha zayıf hidrofobik olan metiyonin amino asitinin daha güçlü hidrofobik özellik sergileyen izolösine dönüşümüne neden olmaktadır. İlk kez tarafımızdan heterozigot olarak belirlendiği için protein fonksiyonu ve kliniğe yansımasına dair net veriler

mevcut değildir. Yapılan *in slico* çalışmalarda, basit virisizan tip KAH'a neden olan I172 ile F-heliks bölgesinde yer alan p.M186 ve p.M187 amino asitlerinin hidrofobik cep oluşturduğu ve 172. amino asit olan izolösinin asparajin ile yer değiştirmesinin hidrofobik cep oluşumuna engel olduğu yönündedir (539). Aynı şeklide p.M187. amino asitte meydana gelen bu değişim hidrofobik cepin oluşumuna olumsuz etki yapması olasıdır. Aynı noktada farklı bir amino asit olan valin varlığı bu bölgenin farklı türlerde korunan baz olmadığını göstermektedir (Şekil 5.3). Diğer taraftan, 187. kodona en yakın olan p.I194N değişimi NKAH hastasında belirlenmiştir (540).

CYP21A2-İnsan	160	IEEEFSLLTCSIICYLTFGDKIKDDNLMPAYYKCIQEVLKTWSHWSIQIVDVIPFLRFFPNPGLRRLKQAIEKRDHIVEM	239
CYP21A2-Domuz	160	IQKEFSVLTCSIICCLTFGDK--EDTLVHALHDCVQDLMKTWEHWSIQILDMVPFLRFFPSPGLRRLKQAIENRDHLVEK	237
CYP21A2-Kurt	160	IQKEFSLLTCAIICHLTFGNK--EDTLVHTFHDCVQDLMRTWEHWSIQMLDIIPFLRFFPNPGLWRLKRALENRDHIVEK	237
CYP21A2-Sığır	160	IQKEFSLLTCSIICYLTFGNK--EDTLVHAFHDCVQDLMKTWDHWSIQILDMVPFLRFFPNPGLWRLKQAIENRDHMVEK	237
CYP21A2-Maymun	160	IEEEFSLLTCSIICHLTFGDKIKEDNLVPAYYKCIQEVLKTWSHWSIQIVDVIPFLRFFPNPGLRRLKQAIEKRDHIVEK	239

Şeklil 5.3. *p.M187I Noktası İçin Farklı Türlerde CYP21A2 Proteinine Ait Dizilerin Karşılaştırması. p.M187I noktası dikdörtgen içerisine alınarak vurgulanmıştır.*

p.V281L *CYP21A2* geninin 7. ekzonunun c.841'inci bazının 281. kodonunda yer alan GTG>CTG değişimi 13 bireyde heterozigot formda belirlenmiştir. Yalancı gen kaynaklı olup, 281. kodondaki valin amino asiti I-heliks üzerinde lokalize olup oldukça sıkışık bir alanda yer almaktadır. I heliks substrat tanıma ve heme bağlanma bölgesi olarak görev aldığı varsayılmaktadır (541). Valin amino asiti nisbeten daha büyük olan lösine değiştiği zaman bulunduğu konum itibari ile yapısal uyuşmazlığa neden olmakta fakat bu durum nisbeten hafif ve tolere edilebilir olduğu için NKAH ile ilişkili kliniğe neden olmaktadır (539).

p.V281L değişimi, hirsutizm şikayeti ile gelen grupta, şikayeti olmayan gruba kıyasla görülme sıklığı uygulanan Fisher kesin ki-kare istatistiki analizine göre anlamlı bulunmuştur (P=0.028). Uygulanan Pearson ki-kare istatistiki analizi ile PKOS, IHA, IH, izole androjen yüksekliği kendi içerisinde bir biri ile kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir.

Uygulanan Fisher kesin ki-kare istatistiki analizine göre p.V281L değişimi ile oligomenore arasında istatistiki açıdan bir ilişkinin varlığı araştırıldığında P=0.059 gibi bir değerle anlamlılık sınırı olan P<0.05 değerine yakın bulunmuştur. Aradaki ilişkinin

varlığı kullanıcak hasta sayısının artması ile iki yönlü olarak değişiklik gösterebilir, dolayısı ile bu amaca odaklanmış bir çalışmanın yapılması daha net verilerin sunulmasına yardımcı olacaktır.

p.V281L değişimi ile gönüllülerin total testosteron seviyeleri arasındaki bağlantı araştırıldığında iki veri arasında istatistiki açıdan önemli bir fark belirlenmemiştir.

p.M283V *CYP21A2* geninin 7. Ekzonunun c.847'inci bazının 283. kodonunda yer alan ATG>GTG değişimi, 1 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. p.V281L ile yakın mesafede ve I heliks üzerinde yer almaktadır. Polar olan methionin moleküler büyüklüğü, hidrofobik olan valinden daha büyük olup bir olasılık yüklerindeki uyumsuzluğun yanında büyüklük farkıda protein fonksiyonu üzerine olan olumsuz etkiyi arttırmış olabilir. p.M283V, p.V281L ile kompound heterozigot olarak kadın NKAH hastasında belirlenmiştir (542), fakat p.V281L NKAH ile ilişkili olduğu için p.M283V'nin etkisi üzerine kesin bir yorum yapmamıza olanak sağlamamaktadır. Zira NKAH ağır ve hafif mutasyonu aynı anda barındıran bireylerde de meydana geldiği gibi iki hafif mutasyonu taşıyan bireylerdede meydana gelebilmektedir (404). Diğer taraftan 2 hafif değişimin kombinasyonun sinerjik etki ile enzim aktivitesi üzerine olan olumsuz etkinin şiddetini arttırdığıda bilinen diğer bir faktör olmasıda net veri sunulması için gerekli olan fonksiyonel çalışmaların önemini sergilemektedir (543).

p.R341W *CYP21A2* geninin 8. ekzonunun c.1021'inci bazının 341. kodonunda yer alan CGG>TGG değişimi, 1 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. Arjinin bazik amino asit olup diğer bazik amino asitler ile redoks partner ve NADP bağlanma bölgeleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (541, 544). Bazik olan arjininin, hidrofilik ve nisbeten daha büyük moleküler ağırlığına sahip triptofan ile yer değiştirmesi proteinin fonksiyonunu olumsuz etkilemesi beklenebilir, zira yapılan *in vitro* çalışmalar p.R341W değişimine sahip olan proteinin kalan enzimatik aktivitesinin 17OHP ve progesteron için sırası ile %5 ve %4 olarak belirlenmiştir. p.R341W değişiminin klitoromegalininde dahil olduğu daha ağır NKAH kliniğine neden olduğu belirlenmiştir. Bu aktivite genitalin prenatal virilizasyonunu ve tuz kaybettiren KAH'ın ortaya çıkmasını engellemek için yeterli olmaktadır (539).

p.R356W *CYP21A2* geninin 8. ekzonunun c.1066'inci bazının 356. kodonunda yer alan CGG>TGG değişimi, 4 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. Bazik olan arjininin, hidrofilik ve nisbeten daha büyük moleküler ağırlığına sahip triptofan ile yer

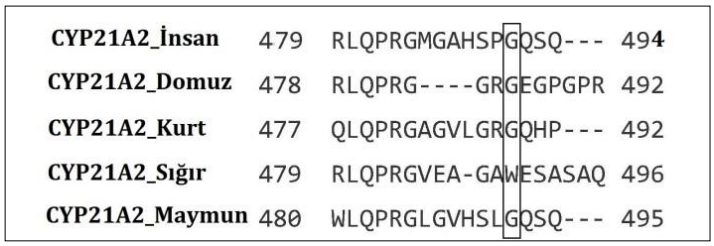
değiştirmesi proteinin fonksiyonunu olumsuz etkilemesi beklenebilir. P.R356W değişimi Q389. amino asit olan glutamin (Q) ile olan hidrojen bağı oluşumunu engeleyerek yapısal uyuşmazlığını arttırarak proteinin 3 boyutlu yapısının oluşmasına neden olmakta ve bu durum enzim aktivesinin kaybı ile sonuçlanmaktadır (539). Tuz kaybettiren KAH hastalarında homozigot olarak belirlenirken, p.V281L gibi ılımlı değişimler ile kompound heterozigot olduğu durumlarda NKAH ile ilişkili olarak belirlenmiştir (404).

p.P453S *CYP21A2* geninin 9. ekzonunun c.1357'inci bazının 453. kodonunda yer alan CCC>TCC değişimi, 2 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. Hidrofobik olan prolin amino asitinin polar olan serine dönüşümü bulunduğu hidrofobik yapıyı etkileyerek enzim fonksiyonu üzerine olumsuz etkiye neden olabilir (539). Yapılan *in vitro* çalışmalar p.P453S değişimine sahip olan enzimin kalan enzimatik aktivitesini progesterona ve 17OHP için sırası ile %36 ve %44 olarak belirlenmiştir (545).

p.P482S *CYP21A2* geninin 10. ekzonunun c.1444'üncü bazının 482. kodonunda yer alan CCC>TCC değişimi, 3 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. Hidrofobik olan prolin amino asitinin polar olan serine dönüşümü enzim fonksiyonu üzerine olumsuz etkiye neden olabilir. Yapılan *in vitro* çalışmalar p.P482S değişimine sahip olan proteinin kalan enzimatik aktivitesinin 17OHP ve progesteron için sırası ile %61 ve %54 olarak belirlenmiştir (539). J heliksin C terminalinde yer alan p.D321, β6'da yer alan p.R483'ün yan zinciri ile hidrojen bağı kurmaktadır. Dolayısı ile bu hidrojen bağı kıvrımlı bölge, J heliks ve β6 arasındaki ikincil yapıyı koruyarak CYP21A2'nin doğru katlanmasına olanak sağlamaktadır (544). Diğer taraftan p.Q481P değişimi bu bölgede kurulan hidrojen bağı ağına olumsuz etki ederek protein stabilizasyon kaybına ve dolayısı ile protein inaktivasyonuna neden olmaktadır (539). Olasılık ile 482. amino asitte meydana gelen bu değişim bu iki durum üzerine etki ederek enzim aktivitesinde azalmaya neden olabilir.

p.G491S *CYP21A2* geninin 10. ekzonunun c.1471'inci bazının 491. kodonunda yer alan GGC>AGC değişimi, 1 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. Bu değişim tarafımızdan ilk kez bildirilmektedir. Glisin yan zincir ihtiva etmediği için polar ya da hidrofobik gibi gruplara dâhil edilememekte, fakat proteinlerin üzerinde genellikle protein kıvrım bölgelerinde (loop) bulunmakta ve bulunduğu bölgelere esneklik sağlamaktadır. Bu noktaya en yakın olan p.N493S değişimi normalin varyantı olarak

tanımlanmıştır (401). Diğer taraftan, aynı noktada farklı bir amino asit olarak sadece bir türde triptofan (W) varlığı bu bölgenin farklı türlerde korunan baz olduğunu göstermektedir (Şekil 5.4).



Şekil 5.4. *p.G491S Noktası İçin Farklı Türlerde CYP21A2 Proteinine Ait Dizilerin Karşılaştırması. p.G491S noktası dikdörtgen içerisine alınarak vurgulanmıştır.*

Çalışma grubunda p.G491S değişimi gen konversiyonu ile birlikte Erciyes Üniversitesi, Endokrin Polikliğine hirsutizm şikâyeti ile gelen ve PKOS tanısı alan kadın hastada belirlenmiştir. Bu iki farklı değişimin aynı ya da farklı alleller üzerinde olup olmadığına dair bir veri olmadığı için PKOS'u moleküler olarak otozomal resesif olarak kalıtılan NKAH'dan ayırt etmek mümkün olmamıştır. Bu hastaya ait hormonal ve klinik bulgular; total testosteron: 52 ng/dl (referans aralığı 11-80), SHBG 36 nmol/L (referans aralığı 32-100), DHEAS 1710 ng/ml (referans aralığı 1330-4410), andorstenedion 1.79 ng/ml (referans aralığı 0.1-3.08), over polikistik, FGS: 14 ve adetlerin düzenli oluşudur.

5.2.1.2. Anlamsız Değişimler

p.Q318X *CYP21A2* geninin 8. ekzonunun c.952'inci bazının 318. kodonunda yer alan CAG>TAG değişimi, 32 bireyde heterozigot olarak belirlenmiş olup, bu çalışmada taşıyıcı sıklığı en fazla olan allel olarak belirlenmiştir. CAG kodunun, translasyonu durdurma kodonu olan TAG (amber)'ye dönüşümü zamanından önce protein sentezinin sonlanmasına ve dolayısı ile kısa protein oluşuma neden olmaktadır. 494 aa'den oluşan normal bir protein 317 amino asitten oluşmakta ve tam fonksiyon kazanımı için gerekli yapıya sahip olamamaktadır. p.Q318X değişimi tuz kaybettiren KAH ile ilişkili olarak belirlenmiştir (546).

Yapılan Fisher kesin ki-kare ve Pearson ki-kare istatistiki analizine göre p.Q318X değişiminin, çalışma grupları, hasta tanıları, total testosteron ve oligomenore ile arasında anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir. Bunun olası primer nedeni fonksiyonel gen olan *CYP21A2* duplikasyonuna bağlı olarak aktif kopyalardan sadece birinde KAH'a

neden olmayan p.Q318X değişim varlığıdır. Yapılan son çalışmalarda bu durumun doğru tanı için ayırt edilmesinin gerekliliği vurgulanmıştır (547). Kopya sayısındaki değişimden kaynaklanan p.Q318X değişiminin sıklığı 38 heterozigot p.Q318X birey ile yapılan çaşılmada 32 kişi ile %84.2 olarak belirlenmiştir (547). Yapılan farklı bir çalışmada belirlenen 17 heterozigot p.Q318X değişiminin tamamı *CYP21A2* duplikasyonu kaynaklı olarak belirlenmiştir (548). Bu çalışmada, *CYP21A2*'nin kopya sayısı belirlenmediği için hangi p.Q318X değişminin patolojik hangisinin duplikasyon kaynaklı olduğu belirlenmemiştir.

5.2.1.3. Çerçeve Kayması Değişimleri

p.R483fs *CYP21A2* geni üzerinde c.2668_2669insC bazında sitozin (C) ilavesine neden olarak bu noktada arjinini kodlayan CGG kodonundan prolini kodlayan CCG dönüşümüne ve devamında sentezlenecek olan protein dizisinin tamamen değişerek, proteinin normalden daha uzun olmasına neden olmaktadır (549). Bu çalışmada, 1 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. Bu değişimin homozigot formu SWKAH ile ilişkili olarak belirlenmiştir (549).

5.2.1.4. Alternatif Kesim Değişimleri

IVS2 -13 A,C>G alternatif kesim verici bölgesi (donor site) değişimi olup, yalancı gen kaynaklıdır. Bu çalışmada, 4 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. İntron 2 üzerinde yer alan sitozin ya da adeninin guanine dönüşümü patalolojik olup SW ya da SV KAH ile ilişkili olarak bulunmuştur (550).

5.2.1.5. Gen Konversiyonu ve Gen Kaybı Değişimleri

Gen konversiyonu homolog ya da yüksek homolojiye sahip DNA dizileri (%92-99) arasında meydana gelen parça değişimi olup, allelik olabileceği gibi, paralog DNA dizileri arasında meydana gelerek ektopik de olabilir. Hastalık ile ilişkili olanlar genellikle yalancı genin verici, aktif genin ise alıcı olduğu durumlarda fonksiyonel olan gene ait parça değişimi sonucu alternatif kesim bölgesi, yanlış anlamlı ya da anlamsız değişimleri ihtiva etmesiyle sonuçlanması ile aktivite kaybı kaynaklıdır (551). *CYP21A2*, sahip olduğu yalancı gen ile gen konversiyonuna gitmesi sonucu bu çalışmada 5 adet gen konversiyonu kaynaklı heterozigot değişim belirlenmiştir. Bu konversiyonlar 2 bireyde ekzon 1-8, 2 bireyde ekzon 1-7 ve 1 bireyde ekzon 4-8 arasında meydana gelmiştir (Tablo 4.2). Meydana gelen gen konversiyonu sonucu

yalancı gen üzerinde mevcut olan kayıp ve/veya anlamsız değişimlerin aktif gene taşınması sonucu aktif gende heterozigot fonksiyon kaybı meydana gelmiştir (Şekil 2.6).

Çalışma grubunda Erciyes Üniversitesi, Endokrin Polikliğine hirsutizm şikayeti ile gelen hastanın klinik bulguları; total testosteron: 113 ng/dl (referans aralığı 11-80), androsteneion: 3.07 ng/ml (referans aralığı 0.1-3.08), SHBG: 32 nmol/L (referans aralığı 32-100), DHEAS: 3229 ng/ml (referans aralığı 1330-4410) olup, hastada USG polikistik ile uyumlu, FGS 10 (+ epile) ve adet düzensizliği mevcuttur. PKOS tanısı alan hastanın yapılan *CYP21A2* gen analizinde, sadece bu hastada PZR yöntemi ile *CYP21A2* genin çoğaltılamaması, *CYP21A2* üzerinde meydana gelen kısmı ya da tam gen kaybı olasılığı şeklinde yorumlanmıştır. Daha önce yapılan çalışmada *CYP21A2* lolalize olduğu bölgede meydana gelen 30kb parça kaybının klasik KAH ve NKAH'a neden olabileceği bildirilmiştir. NKAH tanısı alan hastada 30kb'lik kayıp, ünik *CYP21A2/CYP21A1P* hibrid gen oluşumuna neden olmaktadır. Bu hibrid gen oluşumu sadece promotör değişimleri (Şekil 5.5) ve ekzon 1 üzerinde yer alan p.P30L değişiminin aktif gen üzerine geçişine neden olmakta ve her iki değişimde enzim aktivitesini sırası ile %20 ve %30-60 oranında azalttığı için NKAH'a neden olduğu belirtilmiştir (552). Bu bölgede meydana gelen gen konversiyonları, gen kayıpları ile karıştırılabilir. Her iki durumda da aktif gen değişime uğradığı için hastanın tanısının konulmasında yardımcı olmasına rağmen doğru genetik danışmanlığın verilmesi için, meydana gelen değişimin net olarak belirlenmesi önem kazanmaktadır.

5.2.1.6. Sessiz Değişimler

12 farklı sessiz değişim, ekzon 2, 4, 5. ekzonlar üzerinde belirlenmemiş olup, en fazla değişim 1 ve 7. ekzon olmak üzere 3, 6, 8, 9 ve 10. ekzonlarda belirlenmiştir.

Amino asitlerin (triptofan ve metiyonin hariç) bir den fazla sinonim olarak adlandırılan kodonlar tarafından kodlandığı için genetik kod normalden fazla olarak (codon redundancy) değerlendirilir. Kodonlar tRNA üzerinde bulunan antikodonlar tarafından tanınmaktadır. Kodonun 3' ve antikodonun 5' ucunda bulunan bazın değişken olması bu bağlanmayı ve protein sentezini olumsuz etkilemediği için bu baz wobble ya da oynak baz olarak ifade edilir.

Bu çalışmada belirlenen değişimler sırası ile p.L37L (TTG>CTG), p.P45P (CCA>CCC), p.Q53Q (CAG>CAA), p.P105P (CCG>CCC), p.L129L (CTG>CTA),

p.D210D (GAC>GAT), p.D234D (GAC>GAT), p.L248L (CTC>CTG), p.P267P (CCG>CCT), p.S374S (TCC>TCT), p.P386P (CCG>CCA), p.P490P (CCG>CCA) değişimleridir. p.L37L hariç tamamın da meydana gelen baz değişimi kodonların son bazında meydana gelmiş olup, sadece p.L37L değişimi kodonun birinci bazında meydana gelmiştir. A>C, G>C, C>G, G>T transversiyon değişimleri iken, G>A, G>A, G>A, G>A, T>C, C>T, C>T, C>T transition değişimleridir. Transversiyon değişimleri meydana gelme olasılığı transversiyonlara göre daha fazla olmasına rağmen yüksek olasılıkla meydana geliş mekanizmalarınından kaynaklanan farklanma ile transversiyon değişimleri bu çalışmada da belirlendiği gibi daha sık rastlanmaktadır (553).

Sessiz değişimlerin protein sentezi üzerine olumsuz etkisinin olmadığı yaygın olarak kabul edilen görüş olmasına rağmen, son zamanlarda yapılan çalışmalar dokuya göre kullanılan kodonların farklandığı ve bu durumun protein sentezi hızı, miktarını etkileyebileceği yönündedir. Dolayısı ile translasyon mekanizmasının aynı zamanda proteini oluşturacak olan kodonlar tarafından da kontrol edildiği gösterilmiştir (554, 555).

Bu çalışmaya dâhil edilen genlerdeki sinonim değişimlerin protein ifadesi hızı ya da miktarı üzerine olan etkinin dokuya özgü olarak çalışılması ancak bize daha net verilerin sunulmasına imkân sağlayacaktır.

5.2.1.7. CYP21A2 Varyantları

Ekzon 1 üzerinde, c.27_28insCTG kaynaklı meydana gelen p.9_10insL değişimi, 117 homozigot, 196 heterozigot; ekzon 3 üzerinde lokalize olan p.R102K değişimi c.305 A>G kaynaklı olup, 74 homozigot, 194 heterozigot; ekzon 5 üzerinde yer alan p.D183E değişimi, c.549C>G kaynaklı olup, 1 homozigot, 7 heterozigot; ekzon 7 üzerinde lokalize olan ve c.793 G>C kaynaklı p.S268T değişimi 9 homozigot ve 112 heterozigot; ekzon 10 üzerinde yer alan c.1478 G>A kaynaklı p.N493S değişimi 60 homozigot, 186 heterozigot olarak taranan toplam 392 bireyde belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Belirtilen değişimlerin tamamı normalin varyantı olarak değerlendirilmekte ve enzim fonksiyonu üzerine olumsuz etkiye sahip olmadığı bilinmektedir (401). Buna zıt olarak p.N493S değişiminin patolojik olarak değerlendiren yayına ilave olarak (550), kombine homozigot değişimlerin enzim fonksiyonu üzerine olumsuz etki yapabileceğine dair görüşte mevcuttur (556). Diğer taraftan, p.V211M değişimi ile birlikte aynı allel üzerinde bulunan p.V281L değişimi NKAH ve SV arası klinik sergileyen bir bireyde

belirlenmiştir. Bu durumun izahı, p.V211M gibi normalin varyantı olan bir değişim ile p.V281L gibi NKAH ile ilişkili bir değişimin bir arada bulunması halinde sinerjik olarak protein fonksiyonu üzerine olan olumsuz etkiyi arttırabileceği yönünde olmuştur (557).

p.A159T, p.V211M ve p.A265S değişimleri de normalin varyantı olmasına rağmen bizim yaptığımız çalışmada belirlenmemiştir.

Herbir normalin varyantı ile çalışma grupları, hasta tanıları, total testosteron ve oligomenore arasında uygulanan Pearson ki-kare testi bakımından anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir. Sadece p.D183E değişimi ile yapılan istatistiki analizde hasta tanıları içerisinde PKOS'da istatistiki olarak anlamlıya yakın bir değerde (P=0.056) yüksek olarak belirlenmiştir. Aynı değişimin PKOS tanısı alan bireyde homozigot olarak ve diğer varyantlara göre oldukça az sayıda belirlenmiş olması bu varyantın steroid biyosentez yolağı üzerine etkisinin olabileceği görüşünü desteklemektedir. Diğer taraftan, aynı bireye ait *CYP21A2* geni üzerinde belirlenen p.R102K ve p.N493S homozigot değişimlerine ilave olarak promotör bölgesinde belirlenen heterozigot gen konversiyonu da bu duruma katkı sağlamış olabilir (Tablo 4.17).

5.2.1.8. CYP21A2 Promotör Değişimleri

CYP21A2 geni ve yüksek homolojiye sahip olduğu *CYP21A1P* yalancı geni arasındaki benzerlik sadece protein kodlayan bölgeler ile sınırlı olmayıp, gene ait düzenleyici bölgeleride ihtiva etmektedir. *CYP21A2* ve *CYP21A1P* genlerinin promotör bölgeleri arasındaki yüksek homoloji bu bölgelerde meydana gelen mikro ve/veya makro gen konversiyonlarına neden olan diğer bir etmendir. Proksimal promotör bölgesi -500bp arasından sadece 14 baz ile farklanma göstermektedir (Şekil 5.5). *CYP21A2* genin 5'UTR ucunun ATG başlama kodonundan itibaren ilk 167 bp olan kısmı adrenale özgü protein transkripsiyon faktörleri (ASP) ve spesifik proteinler için bağlanma bölgesi dizileri (Sp)-1 ihtiva etmektedir (558, 559). Bu bölge *CYP21A1P* promotöründen sadece 4 baz ile farklanmaktadır, sırası ile 126, 113, 110 ve 103. pozisyonlardadır (Şekil 5.5).

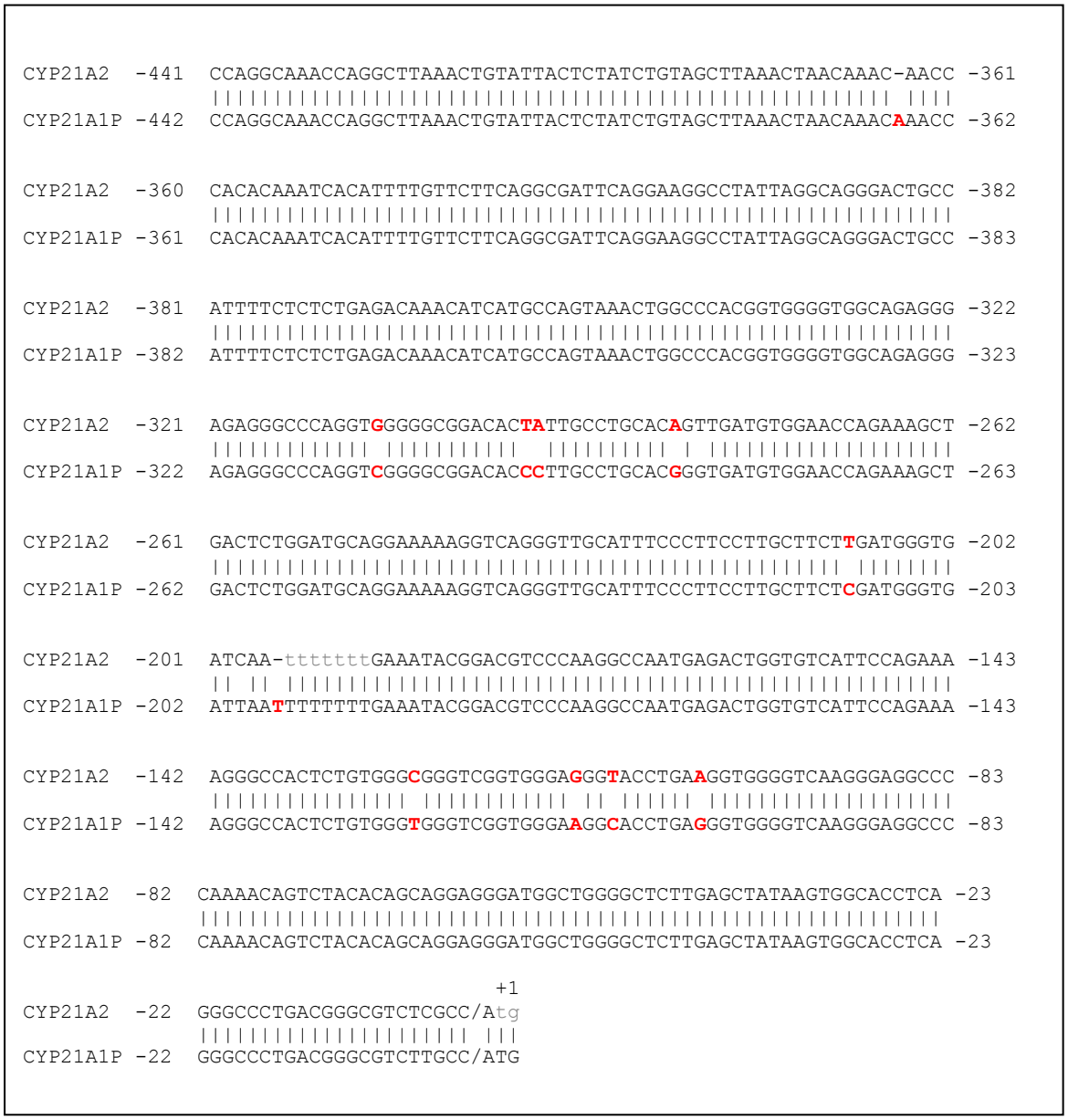
Bizim belirlediğimiz değişimler -73 C>T, -120 G>A, -121 C>T, -308 G>T değişimleri olup, -308 G>T değişimi hariç belirtilen değişimler, promotör bölgesinde bir bireyde 1 baz değişimi olarak belirlenmiştir. -308 noktasındaki değişim *CYP21A1P* kaynaklı G>C olmasına rağmen tarafımızdan belirlenen G>T değişimi, diğer *CYP21A1P* kaynaklı değişimler olan -196insT, -199 T>C, -210 T>C, -282T>G, -284 A>G, -295 A>C, -296

T>C değişimleri ile aynı bireyde belirlenmiştir, bu durum -308 G>T ile diğer *CYP21A1P* kaynaklı değişimlerin farklı alleller üzerinde olma ihtimalini güçlendirmekte fakat aile taraması yapılamadığı için kesin verilerin sunulması mümkün olmamaktadır.

CYP21A1P kaynaklı -199 T>C, -284 A>G, -296 T>C, -308 G>C değişimlerin herbiri tekli olarak farklı bireylerde belirlenmiştir (birey sayıları için Tablo 4.3, 4.9 ve 4.10).

(-103A>G, -110T>C, -113G>A), (-103A>G, -110T>C, -113G>A, -126 C>T), (-103 A>G, -110 T>C, -113 G>A, -196insT, -199 T>C, -210 T>C), (-103 A>G, -110 T>C, -113 G>A, -126 C>T, -196insT, -199 T>C, -210 T>C, -282T>G, -284 A>G, -295 A>C, -296 T>C, -308 G>C) değişimleri heterozigot olarak farklı bireylerde kombine şekilde belirlenmiş olup tamamı *CYP21A1P*'nin verici, *CYP21A2*'nin alıcı olduğu gen konversiyonu esnasında gerçekleşmiştir. Belirlenen diğer bir kombine değişim olan

-103 A>G, -110 T>C, -113 G>A, -126 C>T, -196insT, -196 T>C, -199 T>C, -210 T>C, -308 G>C heterozigot, -282 T>G, -284 A>G, -295 A>C, -296T>C homozigot değişimleri aynı birey üzerinde heterozigot ve homozigot baz değişimleri belirlenmiş olup bu değişimlerin tamamı *CYP21A1P* kaynaklıdır. Heterozigot ve homozigotluğun aynı anda görülmesi 2 defa farklı bölgelerde gerçekleşen gen konversiyonu ya da kalıtılan promotör değişim olasılığını düşündürmektedir. Belirtilen kombine değişimlerde mevcut olan -113 G>A değişiminin tekli olduğu durumlarda yapılan *in vitro* çalışmalarda bu baz noktasının -126 noktasında bulunan Sp1 bağlanma bölgesini olumsuz yönde etkilemesi sonucu yaklaşık %20'ye düşen mRNA ifadesi belirlenmiştir. Sadece -126 C>T noktası ile yapılan çalışmada C>T değişimi kaynaklı olarak mRNA ifadesinin yaklaşık %50 azaldığı belirlenmiştir (558, 560). Diğer taraftan -230 ve -1bp arasında yer alan promotör değişimlerinin mRNA ifadesinin %22'ye kadar azalttığı belirlenmiştir.



Şekil 5.5. *CYP21A1P ve CYP21A2 Proksimal Promotörüne Ait DNA Dizisi Mukayesesi. Farklanan bazlar kırmızı ile işaretlenmiştir.*

Uygulanan Fisher kesin ki-kare ve Pearson ki-kare istatistiki analizlerine göre promotör değişimi ile çalışma grupları, hasta tanıları, total testosteron ve oligomenore arasında anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir.

Çalışmaya gönüllü olarak katılan ve şikayeti olmayan izole androjen yüksekliği tanısı alan 34 yaşındaki bir bireyde homozigot promotör değişimi belirlenmiş olup, belirlenen

değişimin mevcut literatür doğrultusunda NKAH ile uyumludur. Hastanın klinik bulgularında sadece normal olarak değerlendirilen aralıktan farklı olarak total testosteron seviyesi 96 ng/dl (referans aralığı 11-80) olarak belirlenmeştir. Bilindiği gibi NKAH olan yetişkin kadınlarda hirsutizm, oligomenore veya amonera, alopesi ve supfertilite gözlenebilir. Bu kliniklerin ortaya çıkmasında oldukça fazla bireysel farklılıklar mevcut olup, bazılarında hirsutizm veya oligomenore olmaz iken rastlantısal olarak tanı alabilirler (453). Bireysel genetik (haplotip vb) ve çevresel faktörlerin farklı fenotiplerin gelişmesine neden olma ihtimali yüksektir. Bizim bu vakamızda da klinik bulgu olmamasına rağmen hasta rastlantısal olarak genetik açıdan NKAH tanısı almıştır.

Tablo 5.1. *Literatürde Belirlenen CYP21A2 Genine Ait Değişimler ve Özellikleri.*

cDNA	**Protein**	**Kalan Aktivite (%)**	**Ekzon**	**Kaynak**
c. 3G>A (ATG>ATA)	M1I	0	1	(561)
c. 1A>C (ATG>CTG)	M1L	0	1	(562)
c. 1A>G (ATG>GTG)	M1V	0	1	(562)
c. 43G>A (GCC>ACC)	A15T	Nd	1	(563)
c. 56G>A (TGG>TAG)	W19X	Nd	1	(549)
c. 57G>A (TGG>TGA)	W19X	Nd	1	(564)
c.65G>A (TGG>TAG)	W22X	Nd	1	(565)
c.66G>A (TGG>TGA)	W22X	Nd	1	(566)
c.89C>A (CCG>CAG)	P30Q	0.2-0	1	(567)
c. 89C>T (CCG>CTG)	P30L	60-30- 1.3	1	(568, 569)
c.113A>T (CAC>CTC)	H38L	Nd	1	(570)
c. 134 C>T (CCC>CTC)	P45L	Normal	1	(557)
c.140A>G (TAT>TGT)	Y47C	Nd	1	(562)
c.160A>T (AAA>TAA)	K54X	Nd	1	(571)
c.166G>A (GGG>AGG)	G56R	0.7-1.4	1	(572)
c.175T>A (TAC>AAC)	Y59N	Nd	1	(562)
c.185A>T (CAC>CTC)	H62L	44.5-20.7	1	(542, 572)
c.191G>A (GGG>GAG)	G64E	0	2	(573)
c.220A>T (AAG>TAG)	K74X	Nd	2	(574)
c.230T>C (ATT>ACT)	I77T	3-5	2	(575)
c.268G>T (GGC>GTC)	G90V	0	2	(574, 576)
c.291C>A (TAC>TAA)	Y97X	Nd	2	(577)
c.305 G>A (AGG>AAG)	R102K	Normal	3	(401)
c.314C>T (CCG>CTG)	P105L	10-7	3	(543)
c.320T>G (CTG>CGG)	L107R	0.4-0.3	3	(572)
c.356A>G (CAC>CGC)	H119R	31,6-31,5	3	(540, 578)
c.361A>C (AAG>CAG)	K121Q	14-19.5	3	(579)
c. 365 T>C (CTC>CCC)	L122P	0	3	(580)
c.371G>A (CGC>CAC)	R124H	Nd	3	(561)
c.394C>T (CGT>TGT)	R132C	35.4-15.5	3	(581, 582)
c. 418 G>A (GAG>AAG)	E140K	11.3	3	(557)
c.425T>C (CTG>CCG)	L142P	0.4	3	(572)
c.445C>T (CGC>TGC)	R149C	35.8-47.3	4	(581, 582)
c. 449 T>G (ATG>AGG)	M150R	>5	4	(580)
c. 475 G>A (GCC>ACC)	A159T	normal	4	(557)
c. 481G>T(GAG>TAG)	E161X	0	4	(580)
c.497T>C (CTC>CCC)	L166P	0.3-0.4	4	(583)
c.500T>C (CTC>CCC)	L167P	0.7-0.4	4	(584)

c.503C>A (ACC>AAC)	T168N	Nd	4	(585)
c.505T>C (TGC>CGC)	C169R	0.1-0	4	(586)
c.507C>A (TGC>TGA)	C169X	Nd	4	(585)
c.512T>A (ATC>AAC)	I171N	0.7-0.6	4	(587)
c.515T>A (ATC>AAC)	I172N	>2	4	(550)
c.532G>A (GGA>AGA)	G178R	0.4-0	4	(586)
c.533G>C (GGA>GCA)	G178A	19-0	4	(576)
c.549C>G (GAC>GAG)	D183E	Normal	5	(401)
c. 581T>A (ATC>AAC)	I194N	33.2-46.7	5	(578, 588, 589)
c.631G>C (GTG>CTG)	V211L	Nd	5	(409)
c. 631 G>A (GTG>ATG)	V211M	Normal	5	(557)
c.670C>T (CGG>TGG)	R224W	52-45.6	6	(588)
c.682C>T (CAG>TAG)	Q228X	Nd	6	(590)
c.689T>C (ATA>ACA)	I230T	63.1-70.6	6	(584)
c.698G>A (AGG>AAG)	R233K	15-8.1	6	(584)
c.697A>G (AGG-GGG)	R233G	8-2	6	(541, 569)
c.707 T>A (ATC>AAC)	I236N	1-2.4	6	(591)
c.710 T>A (GTG>GAG)	V237E	0-0.1	6	(591)
c.716 T>A (ATG>AAG)	M239K	95-98	6	(591)
c.782T>C (CTC>CCC)	L261P	Nd	7	(592)
c.784C>T (CAA>TAA)	Q262X	Nd	7	(573)
c.794C>T (GCG>GTG)	A265V	92-100	7	(593)
c.795 G>A (GCG>ACG)	A265S	Normal	7	(569)
c.793G>C (AGC>ACC)	S268T	Normal	7	(401)
c.841G>T (GTG>TTG)	V281L	50-20	7	(409)
c.842T>G (GTG>GGG)	V281G	3.9	7	(403)
c.841G>C (GTG>CTG)	V281L	30-50	7	(550)
c.847A>G (ATG>GTG)	M283V	16.2-19	7	(581, 582)
c.847A>T (ATG>TTG)	M283L	Nd	7	(542)
c.871G>A (GGT>AGT)	G291S	0.8	7	(594, 595)
c.871G>C (GGT>CGT)	G291R	Nd	7	(596)
c.871G>T (GGT>TGT)	G291C	0	7	(576)
c.875G>A (GGC>GAC)	G292D	0.5-0.7	7	(584)
c.884 C>A (ACC>AAC)	T295N	Nd	7	(541)
c.898C>T (CTC>TTC)	L300F	9.5-4.4	7	(403)
c.902C>A (TCC>TAC)	S301Y	Nd	7	(596)
c.904T>C (TGG>CGG)	W302R	0.1-0	7	(586)
c.905G>C (TGG>TCG)	W302S	3	7	(593, 597)
c.906G>A (TGG>TGA)	W302X	Nd	7	(598)
c.910G>A (GTG>ATG)	V304M	46-26	7	(599)
c.943C>T (CAG>TAG)	Q315X	Nd	8	(600)
c.946C>T (CGA>TGA)	R316X	Nd	8	(601)
c.949C>A (CTG>ATG)	L317M	Nd	8	(602)
c.949C>G (CTG>GTG)	L317V	Nd	8	(603)
c.952C>T (CAG>TAG)	Q318X	Nd	8	(546)
c.959G>A (GAG>AAG)	E320K	4.6	8	(584)
c.965A>G (GAC>GGC)	D322G	18-27	8	(593, 597)
c.1008C>G (TAC>TAG)	Y336X	Nd	8	(604)
c.1016G>A (CGT>CAT)	R339H	Nd	8	(545)
c.1022G>C (CGG>CCG)	R341P	0.7	8	(605)
c.1021C>T (CGG>TGG)	R341W	5-4	8	(569, 606)
c.1051G>A (GAG>AAG)	E351K	1.1-1.2	8	(607)
c.1058T>G (CTG>CGG)	L353R	Nd	8	(608)
c.1061G>A (CGC>CAC)	R354H	0	8	(574)
c.1060C>T (CGC>TGC)	R354C	Nd	8	(403)
c.1067G>A (CGG>CAG)	R356Q	0.65-1.1	8	(606)
c.1067G>C (CGG>CCG)	R356P	0.15-0.15	8	(606)
c.1066C>T (CGG>TGG)	R356W	0	8	(609)
c.1185C>T (GCC>GTC)	A362V	0	8	(573)
c. 1088T>G (TTG>TGG)	L363W	Nd	8	(610)
c.1093C>T (CAC>TAC)	H365Y	Nd	8	(611)
c.1096 C>T (CGC>TGC)	R366C	38-27	8	(541, 569)

c.1105C>T (CGG>TGG)	R369W	45.8-48.5	8	(584)
c.1123G>A (GGC>AGC)	G375S	<1	9	(599)
c.1128C>A (TAC>TAA)	Y376X	Nd	9	(596)
c.1140G>C (GAG>GAC)	E380D	30	9	(612)
c.1157C>G (CCG>CGG)	P386R	Nd	9	(585)
c.1161C>G (AAC>AAG)	N387K	Nd	9	(613)
c. 1163 T>G (CTC>CGC)	L388R	1.1	9	(557)
c.1171G>A (GCC>ACC)	A391T	38-23	9	(541)
c.1211T>C (TTC>TCC)	F404S	Nd	9	(614)
c. 1214G>A (TGG>TAG)	W405X	Nd	9	(615)
c.1219G>A (GAT>AAT)	D407N	72.7-73.6	10	(578)
c.1223 G>A (CGC>CAC)	R408H	Nd	10	(616)
c.1223 G>T (CGC>CTC)	R408L	Nd	10	(617)
c. 1222C>T (CGC>TGC)	R408C	1.3-0.6	10	(618)
c.1270G>A (GGT>AGT)	G424S	1.6-2	10	(584, 619)
c.1277G>A (CGC>CAC)	R426H	0.4-0.6	10	(586)
c.1277 G>C (CGC>CCC)	R426P	Nd	10	(616)
c.1276C>T (CGC>TGC)	R426C	0-0	10	(586)
c.1291G>A (GAG>AAG)	E431K	2.1-5.6	10	(581, 582, 620)
c.1295C>T (CCG>CTG)	P432L	Nd	10	(621)
c.1301C>T (GCG>GTG)	A434V	14-12	10	(575)
c.1303C>T (CGC>TGC)	R435C	Nd	10	(602)
c.1330C>T (CGA>TGA)	R444X	Nd	10	(597)
c.1337T>C (CTG>CCG)	L446P	0.5-0.0	10	(622)
c.1348A>C (ACG>CCG)	T450P	Nd	10	(614)
c.1357C>T (CCC>TCC)	P453S	50-68/20-46	10	(545)
c.1376C>A (CCC>CAC)	P459H	Nd	10	(623)
c.1375C>T (CCC>TCC)	P459S	Nd	10	(585)
c.1388C>T(CCC>CTC)	P463L	2.6-3.0	10	(597)
c.1419 G>T (ATG>ATT)	M473I	85-66	10	(541, 569)
c. 1436G>T (CGG>CTG)	R479L	76-80	10	(583, 611)
c.1442A>C (CAG>CCG)	Q481P	Nd	10	(624)
c.1441 C>T (CAG>TAG)	Q481X	0	10	(580)
c. 1444C>T (CCC>TCC)	P482S	61-54	10	(569, 625)
c.1448G>A (CGG>CAG)	R483Q	1.1-3.8	10	(596)
c.1448G>C (CGG>CCG)	R483P	1.0-2.2	10	(594, 615)
c.1447C>T (CGG>TGG)	R483W	Nd	10	(549)
c.1478G>A (AAC>AGC)	N493S	Normal	10	(401)
İntronik Değişimler				
IVS 1 as -2 A-G				(565)
IVS2 ds +1 G-A				(601)
IVS ds +5 G-A				(626)
IVS2 as -13 C-G				(550)
IVS2 as -2 A-G				(618)
IVS5 as -2 A>G				(582)
IVS7 ds +1 G-C				(595)
IVS7 ds +2 T-G				(627)
IVS8 ds +1 G-A				(616)
IVS9 as -9 C-A				(628)
IVS9 as -1 G-A				(616)
Baz Kaybı ve Kazanımı Değişimleri				
c.16_25delCTGCTGCTGC	L48X		1	(614)
c.81_93delCACCTCCCGCCTC	H28Fs		1	(629)
c.126_127delC	P42fs		1	(611)
c.141delT	L48fs		1	(630)
c.329_336delGAGACTAC	G110fs		3	(631)
c.549delC	D183fs		5	(596)
c.587_589delAGG	E196del	6-23	5	(594)
c.737delA	E246Fs		6	(632)
c.988_997delTCCAGCTCCC	S330Fs		8	(601)
c.1272_1276delTGCCC	G424fs		10	(616)

c.1378_1395delTCGCTGCAGCCCCTGCCC	S460_P465del		10	(564)
c.1409_1410delGG	G470fs		10	(581)
c.27_28insCTG	9-10insL	Normal	1	(401)
c.64_65insT	W22fs		1	(633)
c.82_83insC	H28Fs		1	(634)
c.478_479insA	I160fs		3	(635)
c.636_637insT	P213fs		5	(561)
c.680_681insA	K227K, Q228fs		6	(636)
c.920_921insT	L307fs		7	(631)
962_963insA	161X e neden oluyor		3	
c.508–509insA	S170fs		4	(618)
c.135_136insC	I46fs		1	(597)
c.201_209dupTGTGGTGGT	61_70 dup		1	(637)
c.1417_1437duplATGCAGCCTTTCCAAGTGCGG	M473_R479dup		10	(597)
c.1175_1190dupCCTGGATGAGACGGTC	V397Fs		9	(601)
c.787_788insC	Q262fs		7	(616)
TGCdelTGinsA	C169fs		4	(638)
c.1447_1448delGGinsC	R483fs		10	(595)
Gen Kaybı ve Yalancı Gen Kaynaklı Değişimler				
30 kb delesyon	CYP21A1P'nin 3' ucu, C4B ve CYP21A2'nin 5' ucunun			(639)
CYP21A1P/CYP21A2 hibrit gen	(CYP21A1P'nin promotör ve p.P30L değişimi/CYP21A2'nin intron 2'den sonraki kısımları)			(552)
delesyon	CYP21A2-C4B'nin tamamı			(617)
delesyon	CYP21A2 ekzon 1-6 ve C4B'nin tamamı			(617)
delesyon	CYP21A2'nin tamamı			(640)
delesyon	CYP21A2'nin tamamı ve TNXA/XA hibrdi geni			(641)
c.62_172dup111bp	p.21_57dup37aa		1	(592)
Gen kazanımı(dublikasyon)	CYP21A2 ve C4B'nin tamamı			(640)
CYP21A1P ile CYP21A geninin 5' ucu	İntron 2 bitişme noktası	Ekzon 1-intron 2 gen konversiyonu		(602)
515T>A; 707T>A; 710T>A; 716T>A; 841G>T; 920_921insT	I172N; I236N; V237E; M239K; V281L; L307fs	Ekzon1-7 gen konversiyonu		(642)
707T>A; 710T>A; 716T>A	I236N; V237E; M239K	Ekzon 6 gen konversiyonu		(631)
-126C>T; -113G>A;-110T>C; -103A>G; 89C>T; 328_335delGAGACTAC; exact extension not defined	Promotör , ekzon 3'de 8bp delesyona kadar uzanan CYP21A2'nin 5' ucu gen conversiyonu	Promotör ve ekzon 3 başlangıç kısmı gen konversiyonu		(631, 643)

-126C>T; -113G>A;-110T>C; -103A>G; 89C>T; 328_335delGAGACTAC; 515T>A; 707T>A; 710T>A; 716T>A; 841G>T; 920_921insT	CYP21A1P ile CYP21A2 Promotör ve ekzon 1-7 arası uzanan büyük gen konversiyonu	Promotör +ekzon 1-7		(631)
707T>A; 710T>A; 716T>A; 841G>T	I236N; V237E; M239K; V281L	Ekzon 6-7		(644)
920_921insT; 952C>T	L307fs; Q318X	Ekzon 7-8		(644)
952C>T; 1066C>T	Q318X; R356W	Ekzon 8		(644)
515T>A; 707T>A; 710T>A; 716T>A; 841G>T; 920_921insT; 952C>T; 1066C>T	I172N; I236N; V237E; M239K; V281L; L307fs; Q318X; R356W	Ekzon 4-8 gen konversiyonu		(645)
-126C>T; -113G>A; -110T>C; -103A>G; 89C>T	Promotor conversion; P30L	Promotör-ekzon 1 gen konversiyonu		(552)
-126C>T; -113G>A; -110T>C; -103A>G; 89C>T	Promotor conversion; P30L; I2 splice			(563)
-126C>T; -113G>A; -110T>C; -103A>G; 89C>T	Promotor conversion; A15T**,** P30L			(563)
707T>A; 710T>A; 716T>A; 841G>T; 952C>T	I2 splice; I236N; V237E; M239K; V281L; Q318X			(563)
841G>T; 920_921insT; 952C>T; 1066C>T	V281L; L307fs; Q318X; R356W			(646)
707T>A; 710T>A; 716T>A; 841G>T; 920_921insT; 952C>T; 1066C>T	I236N; V237E ; M239K; V281L; L307fs; Q318; R356W			(549)
-126C>T; -113G>A;-110T>C; -103A>G	promotör		%20 gen ifadesi	(647)
–447 A > G, –443InsA, –306G > C, –295T > C, –294 A > C, –283 A > G, –281T > G, –210T > C, –199C > T, –196 A > T, –126C > T, –113G > A, –110T > C, –103 A > G, –4C > T ve Q318X	Promotör+Q318X		1-2	(648)
-126C>T	promotör		%52 gen ifadesi	(560)
707T>A; 710T>A; 716T>A; 1330C>T	I236N; V237E; M239K; R444X	Ekzon 6 gen konversiyonu+R 444X		(626)

5.2.2. *CYP11B1* Geninde Belirlenen Değişimler

69 nokta değişimi, 13 alternatif kesim bölgesi, 2 düzenleyici bölge (promotör), 7 küçük gen bölgesi kayıpları, 10 küçük gen parça ilaveleri, 5 faklı kısmı/tam ve 5 farklı kompleks değişimlerin varlığı HGMD sitesinde bildirilmektedir (537) (Tablo 5.2).

Bu çalışmada, biz *CYP11B1* geni üzerinde sessiz, alternatif kesim bölgesi ve yanlış anlamlı olmak üzere 18 farklı değişim belirlenmiş olup, bunların 10 tanesi sessiz, 7 tanesi yanlış anlamlı ve 1 tanesi alternatif kesim bölgesi değişimleridir (Tablo 4.4).

Bu çalışmada, tanılarından bağımsız olarak çalışmaya katılan 392 gönüllüde 60 heterozigotluk tesbit edilmiş olup, *CYP11B1* genine ait Türk kadın popülasyonunda belirlenen patolojik allel taşıyıcılık (heterozigotluk) sıklığı %15.3 olarak belirlenmiştir. Sıklığın bu denli yüksek olmasının nedenleri arasında yüksek akraba evliliğine ilave olarak (538), yüksek homoloji sergilediği *CYP11B2* geni ile arasında meydana gelen mikro ya da makro gen konversiyonları neden gösterilebilir.

p.R43Q ve p.A386V değişimleri en fazla belirlenen değişim olmuşlardır (detaylar için bölüm 5.2.2.2'i bakınız).

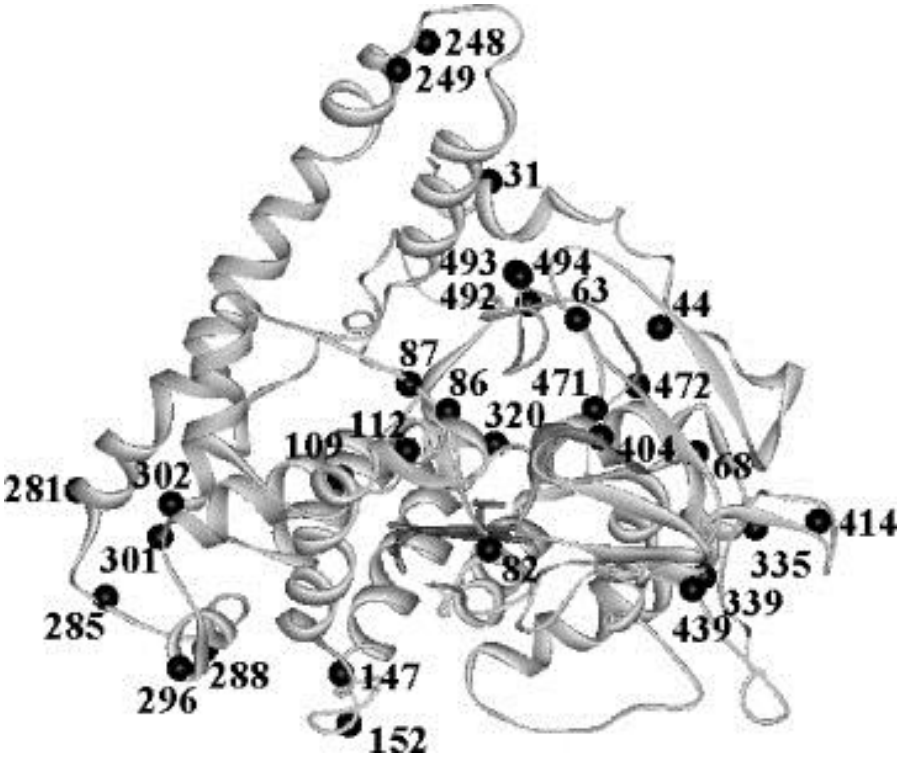
5.2.2.1. Yanlış Anlamlı Değişimler

p.R43Q *CYP11B1* geninin 1. ekzonunda lokalize olup, 43. kodonun c.128'inci bazında meydana gelen CGG>CAG kaynaklıdır. Meydana gelen değişim *CYP11B1*'e özgü olan kodonun *CYP11B2*'ye özgü olan kodon ile değişimi ile sonuçlanmaktadır. A heliks üzerinde yer alan (649) bazik olan arjininin, glutamin ile yer değiştirmesi yük değişimine neden olabilir. Diğer taraftan protein stabilitesi için önemli olan diğer negatif yüklü olan amino asitler ile tuz köprüsü kuran arjininin glutamin ile değişimi protein stabilitesini olumsuz yönde etkileyebilir ve dolayısı ile meydana gelen değişim *CYP11B1* geni üzerinde kısmı aktivite kaybına neden olabilir, zira bu durum yapılan *in vitro* çalışmalar ile de desteklenmiştir. p.R43Q değişimine sahipa allelin %30-50 aktivite gösterdiği belirlenmiştir (650). Diğer taraftan 43. amino asit bölgesine en yakın bölge olan p.P42S değişiminin homozigot formunun NKAH'a neden oluğu belirlenmiştir (482).

p.D63H c.187G>C GAC>CAC değişimi 1 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. Değişim *CYP11B1* proteini üzerinde β1-1 heliks yer almaktadır. Asitik olan aspartik asitin, bazik olan histidine dönüşümü ile değişen yük proteinin 3 boyutlu yapısının oluşumu üzerinde negatif etkiye neden olabilir. Diğer taraftan aynı kodon üzerinde *CYP11B2* ve farklı canlıların *CYP11B1* proteini üzerinde H varlığı bu bölgede meydana gelen H değişiminin tolere edilebileceği olasılığını güçlendirmektedir (Şekil 5.6). Bu değişim yaygın olarak kabul edilen substrat tanıma bölgeleri üzerinde yer almamasıda bu olasılığı güçlendirmektedir (651). Eşey hücrelerinde rastlanmayıp bilindiği kadarı ile sadece meme kanseri hücrelerinde belirlenen somatik bir değişim olması nedeni ile KAH üzerine olan patolojik etkisi bilinmemektedir.

CYP11B1-İnsan	--MALRAKAEVCMAVPWLSLQRAQALGTRAARVPRT-VLPFEAMPRRPGNRWLRLLQIWREQGYEDLHLEVHQTFQELGP	77
CYP11B2-İnsan	--MALRAKAEVCVAAPWLSLQRARALGTRAARAPRT-VLPFEAMPQHPGNRWLRLLQIWREQGYEHLHLEMHQTFQELGP	77
CYP11B1-Maymun	--MALRAKAEVCMAAPWLSLQRARALGTRATRVPRT-VLPFEAMPRRPGNRWLRLLQIWREQGYEHLHLEVHQTFQELGP	77
CYP11B1-Domuz	--MAFRLKSDVRLAGSWLCLRGARALGTRAVTASKASVLPFEVIPQHQGNKRQRVLQFWKEQNHDDLHLEMHQTFQELGP	78
CYP11B1-Fare	MTMALRVTTDVWLARPWQCLHRTRALGTTATLAPKT-LQPFEAIPQYSRNKWLKMIQILREQGQENLHLEMHQVFRELGP	79
CYP11B1-Sıçan	--MALRVTADVWLARPWQCLHRTRALGTTAKVAPKT-LKPFEAIPQYSRNKWLKMIQILREQGQENLHLEMHQAFQELGP	77
CYP11B1-Sığır	--MALWAKARVRMAGPWLSLHEARLLGTRGAAAPKA-VLPFEAMPRCPGNKWMRMLQIWKEQSSENMHLDMHQTFQELGP	77

Şekil 5.6. *Farklı Türlerde CYP11B1 Proteinine Ait Dizilerin Karşılaştırması. p.D63H noktası dikdörtgen içerisine alınarak vurgulanmıştır.*



Şekil 5.7. *CYP11B1 ve CYP11B2 Arasındaki Amino Asit Değşimlerinin Dağılımı. Amino asit değişimleri 3 boyutlu, CYP11B2 proteini ribbon modeli üzerinde siyah noktalar halinde belirtilmiştir. 386. amino asit de CYP11B1 ve CYP11B2 arasında farklılık göstermesine rağmen şekil üzerinde yer verilmemiştir.*

Kaynak: Lisurek and Bernhardt, 2004:215 (652).

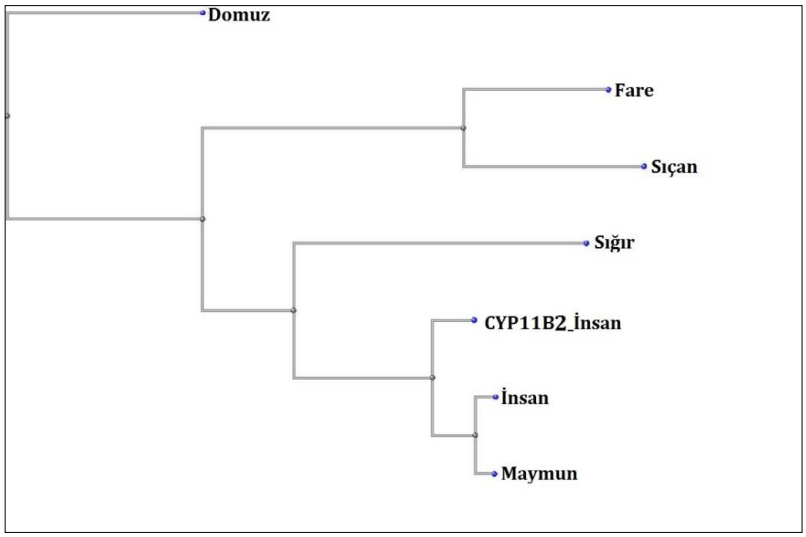
p.G87A *CYP11B1* geninin 2. ekzonunun c.260'ıncı bazının 87. Kodonunda yer alan GGC>GCC değişimi 1 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. Glisin yan zincir ihtiva etmediği için polar ya da hidrofobik gibi gruplara dâhil edelimemekte, fakat proteinlerin yüzeyinde genellikle protein kıvrım bölgeleri (loop) üzerinde bulunmakta ve bulunduğu bölgelere esneklik sağlamaktadır, diğer taraftan glisin ve alanin amino asitlerinin

birbirlerine yakın olmasından dolayı tam bir aktivite kaybı yerine azalan aktivite kaybı olasıdır ve bu değişim yaygın olarak kabul edilen substrat tanıma bölgeleri üzerinde yer almamaktadır (651).

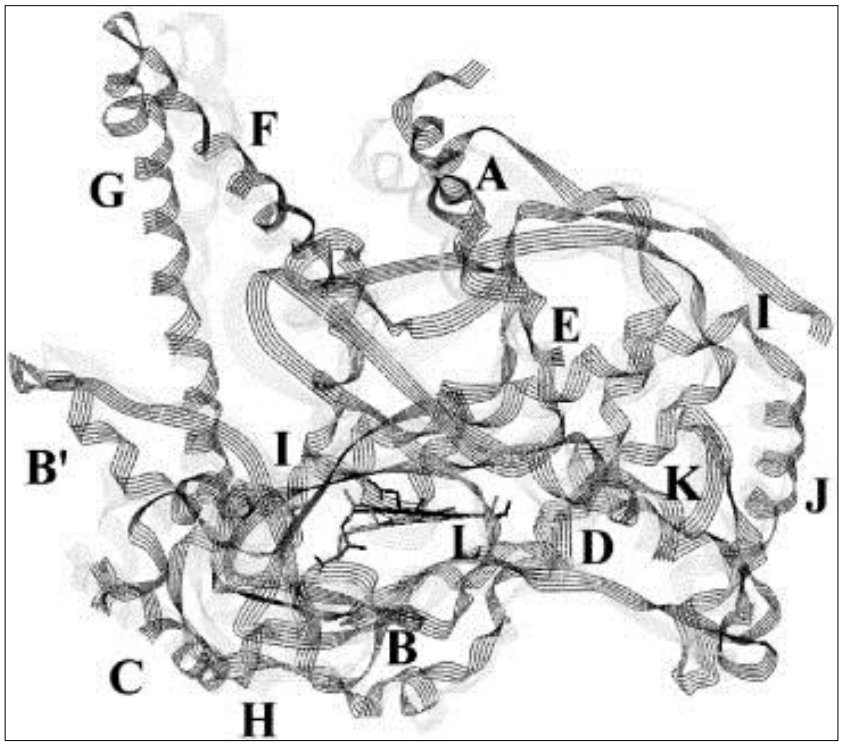
CYP11B1_İnsan	78	IFRYDLGGAGMVCVMLPEDVEKLQQVDSLHPHRMSLEPWVAYRQHRGHKCGVFLLNGPEWRFNRLRLNPEVLSPNAVQRF	157
CYP11B2_İnsan	78	IFRYNLGGPRMVCVMLPEDVEKLQQVDSLHPCRMILEPWVAYRQHRGHKCGVFLLNGPEWRFNRLRLNPDVLSPKAVQRF	157
CYP11B1_Maymun	78	IFRYDLGGAGMVCVMLPEDVEKLQQVDSLNPRRMSLEPWVAYRQHRGHKCGVFLLNGPEWRFNRLRLNPDVLSPRAVQRF	157
CYP11B1_Domuz	79	IFRCDVGSTRIVAVMLPEDCARLHQAESPYPHRMHLEPWMAYREHRRQNLGVFLLNGPEWLSNRRWLNPNVLSPKAVQNL	158
CYP11B1_Fare	80	IFRHSVGKTQIVFVTLPEDVEKLYQVESTHPCRMPLESWIVHRELRGLGRGVFLLNGPEWYFNRLQLNPNVLSPKAVQKF	159
CYP11B1_Sıçan	78	IFRHSAGGAQIVSVMLPEDAEKLHQVESILPHRMPLEPWVAHRELRGLRRGVFLLNGADWRFNRLQLNPNMLSPKAIQSF	157
CYP11B1_Sığır	78	IFRYDVGGRHMVFVMLPEDVERLQQADSHHPQRMILEPWLAYRQARGHKCGVFLLNGPQWRLDRLRLNPDVLSLPALQKY	157

Şekil 5.8. *Farklı Türlerde CYP11B1 Proteinine Ait Dizilerin Karşılaştırması. p.G87A noktası dikdörtgen içerisine alınarak vurgulanmıştır.*

Tarafımızdan ilk kez belirlendiği için literatür bilgisi mevcut değildir fakat, p.G87A değişimine en yakın belirlenen A-B bağlanma bölgesinde yer alan (A-B connecting region) p.M88I değişiminin yapılan *in vitro* çalışmada NKAH ile ilişkili olarak belirlenmiştir (653). Diğer taraftan filogenetik olarak 87. amino asitin farklı türlerde farklılık göstermesi (Şekil 5.8) en yakın iki tür olan maymun ve insanda (Şekil 5.9) ise aynı amino asiti ihtiva etmesi bu bölgenin korunaklı olmadığını göstermektedir.



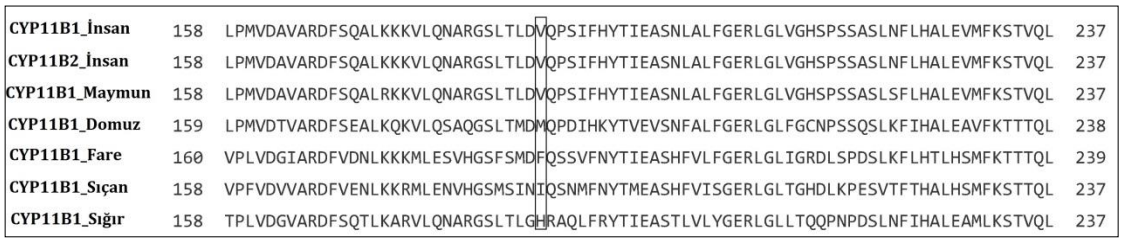
Şekil 5.9. *Bazı Türlerin CYP11B1 Proteini Açısından Yakınlıklarını Göstermek Amacı İle Oluşturulan Filogenetik Ağaç. Filogenetik ağacın oluşturulmasında türlere ait protein dizileri kullanılmıştır.*



Şekil 5.10. *CYP11B1 (siyah) ve CYP11B2 (gri) Proteinlerine Ait Homoloji Model Ribbon Yapısı. Protein üzerindeki Helix'ler büyük harf ile etiketlenmiştir.*

Kaynak: Lisurek and Bernhardt, 2004:215 (652).

p.V188I *CYP11B1* geninin 3. ekzonunun c.562'inci bazının 188. kodonunda yer alan GTC> ATC, değişimi 1 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. Değişim protein üzerinde E' heliks'de yer almaktadır (Şekil 5.10). Valin ve izolösin amino asitlerini hidrofobik gruba ait olup, benzerlik ihtiva etmeleri ve *Rattus norvegicus* (Sıçan)'a ait *CYP11B1* proteini üzerinde aynı kodonda izolösinin varlığı bu bölgenin konservatif olmadığını ve enzim aktivitesini tamamen elimine edecek bir etkiye sahip olmadığı olasılığını göstermektedir (Şekil 5.11). Bu değişim tarafımızdan ilk defa belirlendiği için literatür bilgisi mevcut olmamakla birlikle, en yakın kodon değişimi p.L186V olup yapılan *in vitro* çalışmada bu bölgede oldukça benzer iki amino asit olan lösin ve valin arasında meydana gelen amino asit değişimi 11-deoksikortizolün kortizole olan dönüşümünü normal proteine göre arttırırken DOC'un korkikosterona olan etkisi üzerine olumlu etkisi söz konusu değildir. Bu etkinin nasıl meydana geldiği bilinmemektedir (650).



Şekil 5.11. *Farklı Türlerde CYP11B1 Proteinine Ait Dizilerin Karşılaştırması. p.V188I noktası dikdörtgen içerisine alınarak vurgulanmıştır.*

Diğer taraftan meydana gelen amino asit değişimlerinin sahip oldukları fiziksel ve kimyasal özelliklerin yanı sıra protein üzerinde meydana geldikleri noktalara ve proteinin önemli fonksiyonel bölgelerine olan mesafe ve konumlarıda protein fonksiyonu üzerine olan etkisini belirleyen faktörler arasındadır (650).

p.R246H *CYP11B1* geninin 4. ekzonunun c.737'inci bazının 246. kodonunda yer alan CGC>CAC, değişimi 1 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. Değişim rs148066255 olan kimlik numarası ile NCBI dbSNP veri tabanlarında yer almasına rağmen patolojik olup olmadığına dair bir veriye rastlanmamıştır. Bazik olan arjininin yine bazik olan histidin ile yer değiştirmesine rağmen iki amino asit arasındaki düşük benzerlik enzim fonksiyonu üzerine olsumsuz etkiye neden olabilir. 246. kodonun CYP11B1 ve *CYP11B2* proteinleri üzerinde ve farklı türlerde oldukça konservatif amino asit bu noktanın önemli olabileceğini olasılığını güçlendirmesine rağmen (Şekil 5.12), homozigot olarak belirlenmemiş olması bu değişimin patolojik olma olasılığı üzerine yorum yapmamızı engelleyen diğer bir faktör olmaktadır.



Şekil 5.12. *Farklı Türlerde CYP11B1 Proteinine Ait Dizilerin Karşılaştırması. p.R246H noktası dikdörtgen içerisine alınarak vurgulanmıştır.*

p.N335D, *CYP11B1* geninin 4. ekzonunun c.1003'üncü bazının 335. kodonunda yer alan AAC>GAC değişimi 1 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. Asparajinin asparatik asite dönüşümü var olduğu pozisyona negatif yük getirmektedir. *CYP11B2* proteinin 335. kodonunda D varlığı, bu değişimin *CYP11B2* kaynaklı olabileceği olasılığını arttırmaktadır. Diğer taraftan *CYP21A2* geninden farklı olarak *CYP11B1* geninin yüksek homoloji gösteren *CYP11B2* geni ile olan küçük veya büyük parça değişimlerinin enzim fonksiyonunu yok etme yerine fonksiyonu üzerinde azalan ya da farklı fonksiyon kazanımlarına neden olma olasılığı *CYP21A1P* geni gibi fonksiyonel olmayan yalancı gen olmayıp, *CYP11B2* proteininde aktif protein olmasından dolayı daha yüksek olasılığa sahiptir (654). *CYP11B1* ve *CYP11B2* genleri üzerinde fonksiyon farklanmasına neden olan amino asit bölgelerinin *in vitro* olarak araştırıldığı çalışmada 320 ve 335. kodonlarda yapılan *CYP11B2*'ye özgü sırası ile A ve D amino asitlerin, sırası ile V ve N olarak *CYP11B1* proteinine aktarılması ile, %20 oranında CYP11B2 proteinine ait olan 18-oksidaz fonksiyonu gösterdiği belirlenmiştir (655). Dolayısı ile artan *CYP11B2* aktivitesinden şüphelenilen klinik durumlarda sadece *CYP11B2* genine ilave olarak *CYP11B1* geni üzerinde de değişim aranması gerekli olabilir.

p.A386V, *CYP11B1* geninin 7. ekzonunun c.1157'inci bazının 386. kodonunda yer alan GCG>GTG değişimi 2 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. p.A386V'de p.R43Q, p.D63H ve p.N335D gibi CYP11B2 kaynaklıdır. Bu değişim bazı kaynaklarda normalin varyantı olarak sağlıklı bireylerde belirlenmiş olmasına (654) rağmen bazı yayınlarda patolojik olarak (653) belirtilmiştir. *İn vitro* çalışma mevcut olmamakla birlikte, *CYP11B2* geni üzerinde belirlenen V386A değişimi ile yapılan çalışmada enzimatik fonksiyonu üzerine hafif olumsuz etkisinin olduğu fakat bu etkinin patolojik olabilmesi (CMO II (kortikosteron metiloksidaz tip II) eksikliğine neden olması) için farklı değişimler ile kombine halde bulunması gerektiği yönündedir (656, 657), zira belirlenen homozigot değişim klinik ve biyokimyasal olarak normal olan bireylerde ve Fransız popülasyonunda normalin varyantı olarak yaygın olarak bulunduğu belirlenmiştir (658). Farklı bir çalışmada p.V386A değişiminin, normal hamilelik geçiren grupta (n:24) bulunmaz iken preeklemsia geçiren grupta (n:42), 7 bireyde (%17) belirlenmesi (659) bu değişimlerin farklı patolojilere neden olabileceği ya da tahmin edildiği kadar masum olamayacağı hipotezini güçlendirmektedir.

5.2.2.2 Kombine Değişimler

Bizim yaptığımız çalışmada *CYP11B2* kaynaklı **p.R43Q** ve **p.A386V** değişimleri (650) kombine olarak 43 bireyde heterozigot, 1 bireyde homozigot ve 2 bireyde p.R374R değişimi ile kombine halde heterozigot olarak bulunması bu değişimin Türk kadın popülasyonunda oldukça yaygın olduğunu göstermesinin yanı sıra *CYP11B1* ve *CYP11B2* genleri arasında meydana gelen gen konversiyonu sıklığını sadece p.R43Q ve p.A386V kombine değişimleri dâhil edildiğinde %11.5 iken, *CYP11B2* kaynaklı diğer tekli değişimler olan p.D63H, p.A386V ve p.N335D'nin ilavesi ile %12.5'e yükselmekte ve toplumda heterozigot taşıyıcılık oranının ve/veya (akraba evliliği ya da sıklığı fazla olan gen konversiyonu kaynaklı) dolayısı ile sonraki kuşaklarda kompound heterozigot ya da homozigot değişim oranının artmasına zemin oluşturma kapasitesine sahiptir. Diğer taraftan, yüksek taşıyıcılık oranına rağmen dikkat çekici bir nokta bizim yaptığımız bu çalışmada homozigot p.R43Q ve p.A386V değişimine sadece bir bireyde rastlanmış olmasıdır.

Türk pouplasyonda yapılan çalışmada PKOS grubuna uygulanan ACTH sitümülasyon testi sonucuna göre, PKOS tanısı alan grupta 11OH eksikliği sıklığı 21OH eksikliğinden fazla belirlenmiştir (508). Bunun nedeni gen konversiyonu sonucu meydana gelen kombine heterozigotluk olabilir, fakat bu çalışmada bu grup gönüllülere ACTH testi yapılamadığı için kesin veri sunulamamaktadır. Diğer taraftan belirlenen p.R43Q ve p.A386V kombine değişimi ile hasta grupları (hirsutizm ve gönüllü) için ugulana Fisher Kesin Ki-kare istatistiki analizine ve alt grupları (IHA, IH, PKOS vb) arasında uygulanan Pearson Ki-kare istatistiki analizine göre önemli bir fark belirlenmemiştir.

Çalışmaya gönüllü olarak katılan ve şikayeti olmayan 24 yaşındaki bir bireyin klinik bulguları, total testosteron 112ng/dl (referans aralığı 11-80), androstenedion 2.94ng/ml (referans aralığı 0.1-3.08), DHEAS 3116 ng/ml (referans aralığı 1330-4410), SHBG 28 nmol/L (referans aralığı 32-100), USG polikistik, FGS 6 ve adet düzensizliği şikayeti olmayan, ve rastlantısal olarak *CYP11B1* geninin moleküler analizi sonucu belirlenen homozigot p.R43Q ve p.A386V değişimleri ile NKAH tanısı almıştır.

5.2.2.3. Sessiz Değişimler

Taranan 392 bireyde 11 farklı sessiz değişim *CYP11B1* geni üzerinde belirlenmiş olup, ekzon 1, 2, 3, 5 ve 6. ekzonlar üzerinde lokalizedir.

p.R374R *CYP11B1* geni üzerinde 374. kodonun CGG>AGG, c.1120'inci bazında meydana gelen C>A değişimi 6. ekzonun son ikinci bazında yer almasından dolayı alternatif kesim bölgesine olası etkisinin olabileceği ihtimali düşünülmüştür. Diğer taraftan yapılan veri tabanları taramalarında NCBI tarafından bu değişim rs61752786 kimlik numarası ile daha önce tanımlanmış olup, patolojik olmasının ihtimalinin yanı sıra normalin varyantı olarak da iki farklı klinik veri ile tanımlanmıştır.

Bu çalışmada belirlenen diğer sessiz değişimler p.L16L (CTG >TTG), p.G46G (GGC>GGT), p.L75L (CTA>CTG), p.Y81Y (TAC>TAT), p.D82D (GAC> GAT), p.R143R (CGG>CGA), p.Y275Y (TAT>TAC), p.A291A (GCG>CGA), p.L362L (CTG>CTC), p.R366R (CGT>CGG) değişimleri olup ekzon 4, 7, 8 ve 9. ekzonlar üzerinde sessiz değişim belirlenmemiştir. A>G, C>T, C>T, C>T, G>A, G>A, T>C değşimleri transition olup, A>T, G>C, T>G değişimleri transversiyon değişimleridir. *CYP21A2*'de olduğu gibi transition değişmleri *CYP11B1* geninde de transversiyona göre yüksek oranda belirlenmiştir. Değişimlerin p.L16L hariç tamamı wobble bazı üzerinde meydana gelmektedir.

p.L16L ve p.G46G haricinde belirlenen değişimlerin tamamı belirli kimlik numarası ile (rs ya da SNP kimlik numarası) NCBI veri tabanında mevcut değildir. Bu durum p.L16L ve p.G46G sessiz değişimlerinin ilk kez tarafımızdan belirlendiği olasılığını güçlendirmektedir.

Tablo 5.2. *Literatürde Belirlenen CYP11B1 Genine Ait Olarak Değişimler ve Özellikleri.*

c.DNA	**Protein**	**Ekzon**	**Kalan Aktivite (%)**	**Kaynak**
c.55 C>T (CAA>TAA)	Q19X	1	Nd	(654)
c.124C>T (CCC>TCC)	P42S	1	15	(482)
c.128G>A (CGG>CAG)	R43Q	1	30-50	(650)
c.248T>G (TTG>TCG)	L83S	2	3	(650)
c.264G>A (ATG>ATA)	M88I	2	40	(653)
c.281C>T (CCG>CTG)	P94L	2	0-2	(478, 660)
c.346T>G (TGG>GGG)	W116G	2	0	(653)
c.347G>A (TGG>TAG)	W116X	2	0	(661)
c.348G>C (TGG>TGC)	W116C	2	2.9	(662)
c.374A>G (CAC>CGC)	H125R	2	30-50	(650)
c.385G>A (GTG>ATG)	V129M	2	0	(663)
c.397A>C (AAT>CAT)	N133H	3	17	(482)
c.403C>T (CCT>TCT)	P135S	3	2-10	(650)
c.415T>C (TTC>CTC)	F139L	3	30-50	(650)
c.421C>T (CGA>TGA)	R141X	3	4.9	(664)
c.422G>A (CGA>CAA)	R141Q	3	Nd	(665)
c. 427 C>T (CGG>TGG)	R143W	3	8	(666)
c. 443 T>G (GTG>GGG)	V148G	3	3.9	(664)

c.449 C>T (TCG>TTG)	S150L	3	19	(667)
c. 463 C>T (CAG>TAG)	Q155X	3	Nd	(668)
c.473T>C (CTC>CCC)	L158P	3	3	(650)
c.476C>T (CCG>CTG)	P159L	3	25	(653)
c.494C>A (GCC>GAC)	A165D	3	2	(653)
c.517 A>T (AAG>TAG)	K173X	3	Nd	(668)
c.520A>T (AAG>TAG)	K174X	3	Nd	(669)
c.558 C>G (CTG>GTG)	L186V	3	Nd	(650)
c.586A>G (ACC>GCC0	T196A	3	30-50	(650)
c.740G>A (TGG>TAG)	W247X	4	Nd	(663)
c.776C>A (GCC>GAC)	A259D	4	Nd	(474)
c.793C>T (CAG>TAG)	Q265X	4	Nd	(670)
c.799G>C (GGC>CGC)	G267R	5	Nd	(671)
c.800G>A (GGC>GAC)	G267D	5	Nd	(671)
c.896T>C (CTG>CCG)	L299P	5	1.2	(4, 662)
c.917C>T (GCC>GTC)	A306V	5	0	(666, 672)
c. 928 G>A (GAA>AAA)	E310K	5	0	(666)
c.940G>C (GGG>CGG)	G314R	5	0	(670)
c.952A>C (ACG>CCG)	T318P	5	Nd	(672)
c.954 G>C (ACG>ACC)	T318T	5	Nd	(671)
c.953C>T (ACG>ATG)	T318M	5	O	(669)
c.953C>G (ACG>AGG)	T318R	5	Nd	(654)
c.956C>T (ACG>ATG)	T319M	6	37	(482)
c.961T>G (TTT>GTT)	F321V	6	Nd	(653)
c.992C>T (GCT>GTT)	A331V	6	0	(663)
c. 995 G>A (CGG>CAG)	R332Q	6	6	(666)
c.1012C>T (CAG>TAG)	Q338X	6	Nd	(669)
c.1021C>A (CGC>AGC)	R341S	6	Nd	(653)
c.1066C>T (CAG>TAG)	Q356X	6	Nd	(669)
c.1096C>T (CGT>TGT)	R366C	6	23	(653)
c.1103C>A (GCC>GAC)	A368D	6	1	(478)
c.1112A>G (GAG>GGG)	E371G	6	0	(663)
c.1121G>A (CGG>CAG)	R374Q	7	0	(669)
c.1136G>T (GGT>GTT)	G379V	7	Nd	(673)
c.1151G>A (CGA>GGA)	R384Q	7	Nd	(674)
c.1150C>G (CGA>CAA)	R384G	7	0	(669)
c.1157C>T (GCG>GTG)	A386V	7	Nd	(650)
c.1201A>G (ACA>GCA)	T401A	8	37	(653)
c.1269T>G (TAT>TAG)	Y423X	8	Nd	(482)
c.1280G>A (CGC>CAC)	R427H	8	Nd	(671)
c.1322T>G (GTG>GGG)	V441G	8	0	(669)
c.1331G>A (GGC>GAC)	G444D	8	Nd	(675)
c.1337G>T (GGC>GTC)	G446V	8	Nd	(474)
c.1342C>T (CGC>CAC)	R448C	8	0	(663)
c.1343G>A (CGC>TGC)	R448H	8	0	(661, 669)
c.1358G>A (CGG>CAG)	R453Q	8	1	(485)
c.1360C>T (CGC>TGC)	R454C	8	4.5	(664, 676)
c. 1364 G>A (CGC>CAC)	R454H	8	Nd	(668)
c.1360_c.1361inG	R454fs	8	Nd	(668)
c.1382T>C (CTG>CCG)	L461P	8	Nd	(677)
c. 1414 A>C (CAG>CCG)	Q472P	9	Nd	(668)
c.1466 T>C (TTG>TCG)	L489S	9	Nd	(488)
c. 1481 T>G (TTC>UGC)	F494C	9	Nd	(671)
İntronik Değişimler				
IVS2 as -1 G>A				(668)
IVS3 ds +16 G>T				(678)
IVS4 ds -1 G>A				(679)
IVS4 ds +5 G>C				(680)
IVS5 ds -1 G>C				(681)
IVS5 ds +1 G>C				(682)

IVS5 ds +1 G>A				(671)
IVS5 ds +2 T>G				(474)
IVS 6 ds +5 G>T				(683)
IVS7 as -9 C>A				(664)
IVS7 ds +4 A>G				(684)
IVS8 ds +4 A>G				(685)
Baz Kaybı ve Kazanımı Değişimleri				
c.96delC	R33fs		Nd	(669)
c.199delG	E67fs		Nd	(665)
c.272_273inTG	M92X		Nd	(485)
c.315-342del	S105S*fs*X19		Nd	(663)
del28bp	S105-Ll13		0	(671)
c. 358-362insAGACA	H122fs		Nd	(686)
c.372delG	H125fs		0	(667)
c.481-483delGTG	V161del		Nd	(653)
c.760-777del18bp	K254_A259del		0	(653)
c.1179-1180insAG	N394fs		Nd	(687)
c.1180delA	N394fs		Nd	(688)
c.1210insC	R404fs		Nd	(679)
g.2704_g.3154del	F168_V266del		0	(668)
c.1313_1315delTCT	F438del		0	(662)
c.1393insTGCTGC	Leu463_Leu464dup		0	(667)
c.1390_1392dup (insTGC)	dupL464		0	(663)
c.1359_1360insG	R453fs		3.7	(664)
CYP11B2 Kaynaklı Değişimler				
CYP11B2/CYP11B1 hibrit	Promoter-ekzon1-4/intron4-ekzon 9			(678)
CYP11B2/CYP11B1 hibrit	Promoter-ekzon1-6/ekzon 7-9			(689)
CYP11B1/CYP11B2 hibrit	Promoter-ekzon1-2/intron2den itibaren 11B2			(690)
CYP11B1/CYP11B2 hibrit	Promoter-ekzon1-3/intron3den itibaren 11B2			(690)
CYP11B1/CYP11B2 hibrit	Promoter-ekzon1-3/ekzon 4'den itibaren 11B2			(690)

5.2.3. 3βHSD2 Geninde Belirlenen Değişimler

Mevcut bilinen literatürde 44 nokta, 1 alternatif kesim enzimi, 4 küçük baz kayıpları, 1 adet küçük baz ilaveleri, 1 tane kayıp/ilave (indel), 1 tane tüm gen kaybı ve 1 adet kompleks değişim, HGMD'nin resmi sitesinde (537) mevcut olup, tarafımızdan yapılan literatür bilgilerine göre listelenen değişimler referasnları ile birlikte Tablo 5.3'de yer verilmiştir.

Bu çalışmada, *3βHSD2* geninde ekzon 2 ve 3 üzerinde herhangi bir değişim belirlenmemiş olup, belirlenen değişimler sadece 1 yanlış anlamlı ve 2 sessiz değişim ile sınırlı olup tamamı ekzon 4 üzerinde lokalizedir.

Yapılan farklı çalışmalarda da hirsutizm şikayeti olan yetişkin kadın hastalarda *HSD3β2* eksikliği belirlenmemiştir (503, 691), bu durum *HSD3β2* eksikliğinin hirsutizmin nadir nedenleri arasında olduğunu göstermektedir (692). Bizim yaptığımız çalışmada da *HSD3β2* eksikliğinin PKOS ya da diğer hiperandrojenemi kaynaklı durumlar olan IHA, IH vb klinik bulguların neden olmadığı, yetişkin kadınlarda taşıyıcılık sıklığının %0.25 gibi bir değer ile oldukça düşük olduğu ve dolayısı ile genin oldukça korunaklı olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan 11OHD ve 21OHD eksikliğine bağlı kriptik KAH vakaları bu çalışmada belirlenmesine rağmen aynı durum *HSD3β2* geni için belirlenmemiştir.

5.2.3.1 Yanlış Anlamlı Değişimler

p.A167V *3βHSD2* geninin dördüncü ekzonun c.749'uncu bazında meydana gelen GCG>GTG değişimi kaynaklı olup 1 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. Yapılan fonksiyonel çalışmada p.A167V değişiminin normal proteine kıyasen %81.5 aktivite gösterdiği belirlenmiştir (359). Bu durum alanin ve valin hidrofobik amino asitlerden olup, birbirlerine yakın özelliklere sahip olması ve bulunduğu konum itibari ile protein fonksiyonu açısından tolere edilebilir noktada olduğunu desteklemektedir.

5.2.3.2 Sessiz Değişimler

2 farklı değişim ekzon 4 üzerinde lokalize olarak belirlenmiştir. Bunlar R240R (CGA>CGG) ve T320T (ACA>ACC) değişimleri olup, sırası ile transiyon ve transversiyon değişimleridir.

Tablo 5.3. *Literatürde Belirlenen 3βHSD2 Genine Ait Değişimler ve Özellikleri.*

Kodon Değişimi	Protein	Ekzon	Kalan Aktivite(%)	Kaynak
c.16 C>T(CTT>TTT)	L6F	2	Nd	(693)
c.30 C>A (GCA>GAA)	A10E	2	0	(359, 694)
c.29 C>T (GCA>GTA)	A10V	2	29,1	(359)
c.44 G>A (GGT>GAT)	G15D	2	0	(359, 695)
c.232 G>A (GTC> ATC)	V78I	3	Normal	(696)
c.244 G>A (GCC>ACC)	A82T	3	7,2	(359, 697)
c.244 G>C (GCC>CCC)	A82P	3	Nd	(698)
c.299 A>G (AAT>AGT)	N100S	3	2,8	(359, 699)
c.322 T>A (TTG>AGT)	L108W	4	0,3	(700)
c.385 G>A (GGG>AGG)	G129R	4	11,7	(359, 503)
c.403 G<A (GAA>TAA)	E135X	4	Nd	(701)
c.424 G>A (GAA>AAA)	E142K	4	0	(359, 702)
c.464 C>T (CCG>CTG)	P155L	4	0	(359)
c.500 C>T (GCG>GTG)	A167V	4	81,45	(359, 703)
c.512 G>A (TGG>TAG)	W171X	4	0	(359, 702)

c.518 T>G (CTA>CGA)	L173R	4	52,8	(359, 704)
c.557 C>T (CCC>CTC)	P186L	4	0,2	(700)
c.569 A>C (TAT>TGT)	Y190C	4	1-5	(705)
c.614 T>C (CTG>CCG)	L205P	4	0	(359, 706)
c.638 G>A (AGT>ACT)	S213T	4	40	(359, 696)
c.637 A>G (AGT>GGT)	S213G	4	58,4	(359)
c.646 A>G (AAG>GAG)	K216E	4	58,9	(359)
c.652 T>C (TCT>CCT)	S218P	4	2-12	(705)
c.664 C>A (CCA>ACA)	P222T	4	Nd	(707)
c.665 C>A (CCA>CAA)	P222Q	4	0	(359)
c.707 T>C (TTG>TCG)	L236S	4	Normal	(359, 703)
c.733 G>C (GCC>CCC)	A245P	4	35,4	(359, 702)
c.742-743 GT>AA (GTC-AAC)	V248N	4	Nd	(708)
c.749 G>T (GGT>GTT)	G250V	4	20-27	(709)
c.757 T>A (TAT>AAT)	Y253N	4	0	(359, 702)
c.760 T>G (TAC>GAC)	Y254D	4	0	(359, 710)
c.776 C>G (ACG>AGG)	T259R	4	0	(359, 711)
c.776 C>T (ACG>ATG)	T259M	4	0	(359)
c.852 C>G (AGC>AGG)	S284R	4	32	(696)
c.881G>T (GGC>GTC)	G294V	4	20,5	(359)
c.924 C>G (TAC>TAG)	Y308X	4	Nd	(711)
c.1003 C>T (CGA>TGA)	R335X	4	0	(494)
c.1022 C>T (CCA>CTA)	P341L	4	6	(494)
c.1064 G>A (TGG>TAG)	W355X	4	0	(494)
c.1783 A>C (TGA>TGC)	X373C	4	27	(707)
c.745-46delCGinsT (CGA>TA)	R249X	4	Nd	(708)
Baz Kaybı ve Kazanımı Değişimleri				
c.797delA	N266fs	4	Nd	(712)
c.818delAA	L273fs	4	Nd	(713)
c.867delG	M290fs	4	Nd	(359)
c.687del27pb	A229fs	4	Nd	(359)
c.953delC	T318fs	4	Nd	(714)
c.558insC	T187fs	4	Nd	(493, 702)

5.3. CYP21A2, CYP11B1, HSD3B2 Genlerinde Meydana Gelen Değişimler ve Hasta Tanılarının Karşılaştırılması/İstatistiki Verilen Değerlendirilmesi

Klinik ve/veya hormonal değerler açısından çeşitlilik gösteren hirsutizm/ hiperandrojenemili kadın hastalar da androjen kaynağının (over ya da böbrek üstü bezi) araştırılması, polikistik over sendromlu hastalarda yapılan çalışmalarda CYP11B1 ve 3BHSD2 genlerine yönelik dizi analizi çalışması bulunmamakta olup, bu genlerde dizi analizinin yapılması, CYP21A2 gen mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan KAH her ne kadar otozomal resesif olarak kalıtılan genetik bir hastalık olsada, heterozigot bireylerde androjen fazlalığı nedeni olabileceği yönündeki görüşün aydınlatılması ve dolayısı ile sadece CYP21A2 değil CYP11B1 ve 3βHSD2 genlerindeki heterozigotluk durumunun hormon seviyeleri üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

5.3.1. Çalışma Grupları ve Hasta Tanılarına Göre *CYP21A2, CYP11B1* ve *3βHSD2* Genlerine Ait Patolojik Değişimlerin Taşıyıcılık Durumu

5.3.1.1 Gönüllü Grubu

Klinik şikayeti olmayan grupta oluşturulan alt gruplar ayrı ayrı ele alınarak gen bazında belirlenen değişimler verilmiştir (Tablo 5.4).

Klinik ve biyokimyasal açıdan sağlıklı olarak değerlendirilen 172 bireyden oluşan grupta *CYP21A2* geni üzerinde 8 farklı toplamda 28 adet heterozigot patolojik değişim belirlenmiştir. *CYP21A2* promotör bölgesine ait 11 farklı 22 adet değişim, aynı grupta *CYP11B1* genine ait 6 farklı, toplamda 24 adet patolojik heterozigot değişim belirlenmiş olup, bunlardan 16 tanesi R43Q/A386V kombine heterozigot ve 2 tanesi R43Q/R374R/A386V üçlü kombine heterozigot değişimleridir. *3βHSD2* geninde ise 1 adet patolojik değişim heterozigot olarak belirlenmiştir. Toplamda 172 bireyde 75 heterozigot değişim 3 gen ve 1 promotör de belirlenmiş olup bu grupta heterozigot yüzdesi %43.6 olarak bulunmuştur.

PKOS tanısı alan 43 bireyden oluşan grupta *CYP21A2* genine ait 3 farklı 6 adet değişim, aynı genin promotör bölgesine ait 4 farklı 4 adet değişim, *CYP11B1* genine ait 2 farklı 10 değişim ki bunlardan 9 tanesi R43Q/A386V değişimine ait olmakla birlikte *3βHSD2* geni üzerinde herhangi bir değişim belirlenmemiştir. Toplamda 43 bireyde heterozigot değişim 3 gen ve 1 promotör de belirlenmiş olup bu grupta heterozigot yüzdesi %46.5 olarak bulunmuştur.

IHA tanısı alan 12 bireyde *CYP21A2* genine ait değişim belirlenmez iken, aynı genin promotör bölgesine ait 1 adet değişim, *CYP11B1* genine ait 2 farklı 3 adet heterozigot değişim belirlenmiştir. *3βHSD2* geni üzerinde herhangi bir değişim belirlenmemiştir. Veriler doğrultusunda heterozigot yüzdesi %30 olarak bulunmuştur.

IH tanısı alan 7 bireyde *CYP21A2* genine ait 2 farklı değişim, aynı genin promotör bölgesine ait 2 farklı değişim, *CYP11B1* genine ait 2 farklı değişim ve *3βHSD2* genine ait değişim belirlenmemiştir. Veriler doğrultusunda heterozigot yüzdesi %85.7 olarak bulunmuştur.

Tablo 5.4. *Gönüllü Grubunda Tanılara Göre Aday Genlerde Belirlenen Değişimlerin Dağılımı.*

	CYP21A2	**CYP21A2 Promotör**	**CYP11B1**	**3βHSD2**	**% Heterozigotluk**
Normal (n:172)	28	22	24	1	43.6
PKOS (n:43)	6	4	10	-	46.5
IHA (n:12)	-	1	3	-	30
IH (n:7)	2	2	2	-	85.7
İzole Androjen Fazlalığı (n:29)	3	6	4	-	44.8
NKAH (n:2)	-	1*	1*	-	-
OKS (n:5)	1	-	2	-	-

*homozigot değişimleri göstermek için kullanılmıştır.

İzole androjen yüksekliği tanısı alan 29 bireyde *CYP21A2* genine ait 2 farklı 3 adet değişim, aynı genin promotör bölgesine ait 5 farklı 6 adet değişim, *CYP11B1* genine ait 2 farklı 4 adet değişim ve *3βHSD2* genine ait değişim belirlenmemiştir. Veriler doğrultusunda heterozigot yüzdesi %44.8 olarak bulunmuştur.

NKAH tanısı alan 2 kişide, *CYP21A2* ve *3βHSD2* genlerine ait değişim belirlenmez iken, 1 adet *CYP21A2* promotör ve *CYP11B1* genine ait 1 tane kompound homozigot değişim NKAH ile uyumlu olarak bulunmuştur.

OKS kullanan 5 kişilik grupta *CYP21A2* genine ait 1 adet, *CYP11B1* genine ait farklı 2 adet değişim heterozigot olarak belirlenmiştir. *3βHSD2* genine ve *CYP21A2* promotörüne ait değişim belirlenmemiştir. Veriler doğrultusunda heterozigot yüzdesi %60 olarak bulunmuştur.

Heterozigot bireyler ile değişim ihtiva etmeyen bireylerin sahip oldukları FGS ve total testosteron seviyeleri arasında istatistiki olarak önemli bir fark belirlenmemiştir. p.Q318X değişiminin patolojik olup olmaması *CYP21A2* duplikasyonuna bağlı olduğu için analizler p.Q318X değişimi ilave edilerek ve hariç bırakılarak her iki durum içinde uygulanmış fakat her iki durumda da klinik bulgular ile arasında istatistiki açıdan fark belirlenmemiştir.

5.3.1.2 Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup

Hirsutizm şikayeti ile gelen grupta oluşturulan alt gruplar ayrı ayrı ele alınarak gen bazında belirlenen değişimler verilmiştir.

PKOS tanısı alan 94 bireyden oluşan grupta *CYP21A2* genine ait 6 farklı 21 adet değişim, aynı genin promotör bölgesine ait 6 farklı 11 adet değişim, *CYP11B1* genine

ait 3 farklı 11 değişim, *3βHSD2* geni üzerinde herhangi bir değişim belirlenmemiştir. Bu grupta heterozigot yüzdesi %45.7 olarak bulunmuştur.

IHA tanısı alan 12 bireyden oluşan grupta *CYP21A2* genine ait 2 farklı 3 adet değişim, *CYP11B1* genine ait 2 farklı değişim, *3βHSD2* geni ve *CYP21A2* promotör üzerinde herhangi bir değişim belirlenmemiştir. Bu grupta heterozigot yüzdesi %41.6 olarak bulunmuştur.

Tablo 5.5. *Hirsutizm Grubunda Tanılara Göre Aday Genlerde Belirlenen Değişimlerin Dağılımı.*

	CYP21A2	***CYP21A2* Promotör**	***CYP11B1***	***3βHSD2***	**% Heterozigotluk**
PKOS (n:94)	21	11	11	-	45.7
IHA (n:12)	3	-	2	-	41.6
IH (n:14)	3	2	1	-	42.8
NKAH* (n:2)	2	-	-	-	-

IH tanısı alan 14 bireyden oluşan grupta *CYP21A2* genine ait 1 farklı 3 adet değişim, *CYP11B1* genine ait 1 adet değişim, *CYP21A2* promotör üzerinde 2 farklı değişim, *3βHSD2* geni üzerinde herhangi bir değişim belirlenmemiştir. Bu grupta heterozigot yüzdesi %42.8 olarak bulunmuştur.

NKAH tanısı alan 2 bireyde *CYP21A2* genine ait 2 adet homozigot değişim belirlenmiştir.

Heterozigot bireyler ile değişim ihtiva etmeyen bireylerin sahip oldukları FGS ve total testosteron seviyeleri arasında istatistiki (Pearson ki-kare analizi) olarak önemli bir fark belirlenmemiştir. p.Q318X değişiminin patolojik olup olmaması *CYP21A2* duplikasyonuna bağlı olduğu için analizler p.Q318X değişimi ilave edilerek ve hariç bırakılarak her iki durum içinde uygulanmış fakat her iki durumda da klinik bulgular ile arasında istatistiki açıdan fark belirlenmemiştir.

5.3.2. Hasta Tanılarına Göre *CYP21A2, CYP11B1* ve *3βHSD2* Genlerine Ait Patolojik Değişimler

Çalışma grupların oluşma şekillerinden bağımsız olarak sadece hasta tanıları göz önüne alındığında sağlıklı (normal) grup sayısı 172 birey ile sabit kalırken, PKOS grubu 137, IHA grubu 24, IH grubu 21, izole androjen fazlalığı grubu 29, NKAH grubu 4 birey

olarak belirlenmiştir. Bu açıdan heterozigotluk değerleri yeniden belirlenerek Tablo 5.6'de yer verilmiştir.

Tablo 5.6. *Çalışma Gruplarından Bağımsız Olarak Hasta Tanıları ve Belirlenen Değişimlere Ait Değerlerin Karşılaştırması.*

	CYP21A2	***CYP21A2*** **Promotör**	***CYP11B1***	***3βHSD2***	**Toplam % Heterozigotluk**
Normal (n:172)	28	22	24	1	43.6
PKOS (n:137)	27	15	21	-	45.9
IHA (n:24)	3	1	5	-	37.5
IH (n:21)	5	4	3	-	57.1
İzole Androjen Yüksekliği (n:29)	3	6	4	-	44.8
NKAH (n:4)	2*	1*	1*	-	-
OKS (n:5)	1	-	2	-	-

*homozigot değişimleri göstermek için kullanılmıştır. Homozigot değişimlerde % hesaplanmamıştır.

Heterozigot bireyler ile değişim ihtiva etmeyen bireylerin sahip oldukları FGS ve total testosteron seviyeleri arasında istatistiki olarak (Pearson ki-kare analizi) önemli bir fark belirlenmemiştir. p.Q318X değişiminin patolojik olup olmaması *CYP21A2* duplikasyonuna bağlı olduğu için analizler p.Q318X değişimi ilave edilerek ve hariç bırakılarak her iki durum içinde uygulanmış fakat her iki durumdada klinik bulgular ile arasında istatistiki açıdan fark belirlenmemiştir.

5.3.3. *AR* Gen Polimorfizmi ile Klinik Bulguların İstatistiki Olarak Değerlendirilmesi

Yapılan deneysel çalışmalar intra uterin androjene maruz kalan hayvan modellerinde fenotip olarak PKOS'a benzer bulgular elde edilmiştir (715). Dolayısı ile androjen fazlalığının PKOS fizyolojinde önemli rol oynadığı görüşünü desteklemektedir. CAG tekrar polimorfizmi olan CAG tekrar sayısının *AR* aktivitesi ile ters ilişkili olduğu bilinmektedir, yani azalan CAG artan *AR* aktivitesine neden olmaktadır (716). Normal olmayan CAG artışının (>40) spinobulbar kas atrofisine neden olurken (377), normal varyasyon olarak kabul edilen (8-35 CAG) değişimin arasında belirlenen farklılığın artan ya da azalan androjen aktivitesine bağlı gelişen klinik bulgular ile ilişkilendirilmektedir.

Tablo 5.7. *Gönüllü Grubunda Belirlenen Allellerine Ait CAG Tekrar Sayısı Ortalaması, Maksimum, Minimum Tekrar Değerleri ve Biallelik Ortalamalarına Dair Veriler.*

	Birey Sayısı	**Uzun allel CAG ortalaması**	**Min-max değer**	**Kısa Allel CAG ortalaması**	**Min-max değer**	**Biallelik ortalama**
Gönüllü Grubu	270	20.5+2.5	14-32	17.6±2.4	11-26	19.1±2.4
Normal	172	20.5±2.4	15-29	17.8±2.2	11-26	19.2±2.2
PKOS	43	20.7±2.8	15-29	17.1±1.7	13-22	19.8±1.7
IHA	12	20.3±2.9	17-28	17.9±2.3	13-20	19.1±2.4
IH	7	18.7++2.4	14-22	16.1+1.8	13-18	17.4±1.8
İzole Androjen Fazlalığı	29	21.1±3	18-32	17.3±3.7	14-22	19.18±3.8
NKAH	2	18±2.6	16-20	15.5±3.6	14-17	16.8±3.6
OKS	5	22±1.6	20-24	16.4±1.5	14-18	19.2±1.5

Veriler Toplam ve hasta tanıları baz alınarak ayrı ayrı verilmiştir. Standart sapma ± olarak belirtimiştir.

Tablo 5. 8. *Hirsutizm Grubunda Belirlenen Allelleri Ait CAG Tekrar Sayısı Ortalaması, Maksimum, Minimum Tekrar Değerleri ve Biallelik Ortalamalarına Dair Veriler.*

	Birey Sayısı	**Uzun allel CAG ortalaması**	**Min-max değer**	**Kısa allel CAG ortalaması**	**Min-max değer**	**Biallelik ortalama**
Hirsutizm Grubu	122	20.4±2.5	15-30	16.9±2.3	9-23	18.6±2.4
PKOS	94	20.4±2.7	15-30	16.9±2.4	9-23	18.6±2.4
IHA	12	20.8±1.5	19-24	17.6±2.1	13-20	19.3±2.1
IH	14	20.3±1.9	16-23	16.5±2	13-19	18.4±2
NKAH	2	19±2.7	21-17	18.5±1.9	20-17	18.7±1.9

Veriler toplam ve hasta tanıları baz alınarak ayrı ayrı verilmiştir. Standart sapma ± olarak belirtimiştir.

Tablo 5. 9. *Çalışma Grubuna Katılan Katılımcıların Allellerine Ait CAG Tekrar Sayısı Ortalaması, Maksimum, Minimum Tekrar Değerleri ve Biallelik Ortalamalarına Dair Veriler.*

	Birey sayısı	**Uzun allel CAG ortalaması**	**Min-max değer**	**Kısa Allel CAG ortalaması**	**Min-max değer**	**Biallelik ortalama**
Toplam Çalışma Grubu	**372**	**20.5+2.5**	**14-32**	**17.4+2.4**	**9-26**	**19.96+2.4**
Normal	172	20.4±2.4	15-29	17.8±2.2	11-26	19.1±2.2
PKOS	137	20.5±2.7	15-30	17.03±2.5	9-23	18.71±2.5
IHA	24	20.6±2.6	17-28	17.8±2.7	13-20	19.18±2.7
IH	21	19.8±2.6	14-23	16.4±2.5	13-19	18.07±2.6
İzole Androjen Yüksekliği	29	21.1±3	18-32	17.3±3.7	14-22	19.18±3.8
NKAH	4	18.5±2.6	16-21	17±2.7	14-20	17.75±4.6
OKS	5	22±1.6	20-24	16.4±1.5	14-18	19.2±1.5

Veriler toplam ve hasta tanıları baz alınarak ayrı ayrı verilmiştir. Standart sapma ± olarak belirtilmiştir.

Literatürde yapılan bazı çalışmalarda, kısa CAG tekrarı hirsutizm (717) ve erken puberteye (718) uzun CAG erkeklerda infertiliteye neden olmaktadır (719). Yapılan farklı çalışmalarda azalan CAG tekrarının androjen hassasiyetine ve dolayısı ile

PKOS'un önemli özelliklerinde olan overyan hiperandrojenemiye neden olduğunu belirtmektedir (718). Aynı şekilde farklı çalışmalar kısa CAG tekrarı ile PKOS'u ilişkili olarak değerlendirirken (720-723), bu görüşe zıt veriler sunan yayınlarda mevcuttur (724, 725).

Bu çalışmada, grupların hesaplanan CAG tekrar sayısı biallelik ortalamalarının kullanılarak (Tablo 5.7-5.8-5.9) istatistiki analiz yapılmıştır. İstatiski analizler poliQ polimorfizmi ile hirsutizm ve gönüllü grubu, poliQ poliformizmi ve gruplara ait klinik tanıları (NKAH ve OKS hariç) ve poliQ polimorfizmi ile FGS ve total testosteron seviyeleri (Mann Whitney Testi) arasında yapılmıştır. Yapılan istatistiki analizlerde (Kruskal Wallis Test) çalışma grubunun tamamına ait verilerde, normal ve IH arasındaki CAG tekrar sayısındaki azalma istatistiki olarak önemli bulunmuştur (P=0.029). PKOS ve normal arasında yapılan istatistik analizde P değeri 0.053 olarak belirlenmiş olup, anlamlılık değeri olan <0.05'e oldukça yakın bir değer elde edilmiştir (Tablo 5.9).

Kadın ve erkek bireylerdeki gen dozu telafisi (dosage compansation), dişi bireylerin hücrelerinde gerçekleşen X kromozom inaktivasyonu ile temin edilmektedir (726, 727). Bu inaktivasyon gelişimin erken evrelerinde ve maternal ya da paternal allelin mozaik olarak inaktif olması ile meydana gelir (727). *AR*, X kromozom üzerinde yer aldığı için dolayısı ile hangi allelin aktif olduğunun belirlenmesi yapılacak çalışmalarda önemli bir kriter olmaktadır. Yapılan bir çalışma da USG ile PKOS tanısı kanıtlanmış olan hasta grubunda X inaktivasyonu analiz edilmiş ve uzun CAG tekrarının tercihen kısa olana kıyasla ekprese olduğu belirlemiştir (721). Yapılan çalışmalar periferal lenfosit hücreleri kullanılarak yapılmış olup bu durumun dokuya ve hücre tipine göre farklanan X-inaktivasyonu dolayısı ile hangi allelin inaktif olduğunu hiperandrojenemi senptomları ile bağlantılı olarak yansıtmayabilir. Yapılan istatiski analizlerin ne kadar gerçeği yansıttığı tartışma konusudur, dolayısı ile yapılacak olan dokuya özgü çalışmalar daha net verilerin elde edilmesine yardımcı olacaktır.

Diğer taraftan, *AR* geni birinci ekzonunda poliglutamine (Poli-Q, CAG) ilave olarak transaktivasyon domaininde yer alan poliglisin (Poli-G, GGN) bölgesi ihtiva etmektedir. Yapılan çalışmalar yoğunlukla poliQ bölgesi üzerine olup kısa olan allelin artan transaktivasyonu ile ilişkilendirmiştir. Prostat kanser hücre hattı ile yapılan çalışmada azalan PoliQ ihtiva eden *AR*'nın ligand olarak daha az miktardaki androjene gereksinim

duyduğu yönündedir (728). COS-7 hücre hattı ile yapılan farklı çalışmalarda kısalan ya da tamamen elimine edilen PoliQ'nun artan p160'ın (*AR* koaktivitörü) fazla ekspresyonunda artan transaktivasyon gösterdiği belirlenmiştir (729, 730).

PoliG ile yapılan çalışmalarda PoliQ'dan farklı olarak artan GGN tekrarının artan transaktivasyona neden olduğu yönündedir (731), fakat buna zıt yönde veri sunan çalışmanında mevcut olması (732) ihtimalen deney şartlarına kullanılan promotör ve androjen miktarına ya da hücre hattı çeşidine bağlı olarak varyasyon gösterdiği yönündedir ve bilindiği kadarı ile bu konu ile yapılan *in vivo* çalışma mevcut değildir. Diğer taraftan AR aktivitesi sadece CAG ya da GGN tekrarından etkilenmeyip, transktivasyonu p160 gibi koaktivatör varlığının yanı sıra aktif protein için gerekli olan SUMAlasyon (SUMOylation, Small-ubiqutin like modifier,) gibi translasyon sonrası epigenetik modifikasyonlarda (733) bu etmenlerden birkaç tanesidir. Dolayısı ile bu çalışma bizim açımızdan öncü bir çalışma olup, verilerin deneysel çalışmalar ile güçlendirilmesi ve anlamlandırılması gerekmektedir. Ayrıca, kısa ya da uzun CAG tekrarına ilave olarak bireylerin sahip olduğu haplotiplerin PKOS ya da androjen ile ilişkili patolojilerin açığa çıkmasında etken olma ihtimali söz konusudur (734).

Tablo 5.10. *Farklı Popülasyonlarda Kontrol ve PKOS Grubunda Yapılan CAG Tekrar Polimorfizm Çalışmaları.*

	PKOS			**Kontrol**			
	Vaka sayısı	**Biallelik ortalama**	**Standart sapma**	**Vaka sayısı**	**Biallelik ortalama**	**Standart sapma**	**Kaynak**
Türkiye	137	18.71	2.5	172	19.1	2.2	Tablo 5.9
Singapur	91	22.97	0.24	112	23.09	0.23	(720)
Avusturalya	122	23	2.025	83	22.34	2.094	(721)
İspanya(Barselona)*	181	21.3	Nd	124	22	Nd	(718)
Finlandiya	106	21.5	2.2	112	21.5	2.1	(724)
Slovenya	102	22.4	3.5	110	21.9	3.5	(725)
Güney Kore	114	23.3	1.8	205	23.1	2	(735)
Çin (Şanghay)	148	22.88	1.76	104	22.85	1.6	(736)
Amerika Beyaz popülasyonu	270	21.8	3.1	165	22.3	3.11	(722)
Amerika Zenci popülasyonu	37	20.1	3.44	84	20.2	3.08	(722)
Belçika	97	21.93	2.122	31	21.823	3.112	(5)
Güney Hindistan	250	18.74	0.13	299	18.73	0.12	(737)
Güney Hindistan	169	17.4	3.3	175	17.4	3.31	(738)
Almanya	72	21.43	1.87	179	21.99	3.2	(739)

*İstatistiki olarak gruplar arasında anlamlı veri edilen çalışmaları göstermek için kullanılmıştır.

Farklı popülasyon kullanılarak yapılan çalışmalarda farklı CAG tekrar sayısı elde edilmiştir. Bazı popülasyonlara ait tekrar sayılarını içeren bilgiler Tablo 5.10'da yer almaktadır. Bizim yaptığımız çalışmada kontrol ve PKOS grubunda CAG tekrar sayısı açısından en benzer topluluk Güney Hindistan olarak belirlenmiştir. Diğer toplumlar nisbeten daha fazla CAG tekrar sayısı ihtiva etmektedir.

Sonuç olarak Türk kadın popülasyonunda en sık belirlenen değişimler CYP21A2 için Q318X ve V281L, CYP11B1 için R43Q ve A386V değişimleri olarak, taşıyıcılık durumunun hastalık etmeni (hafif androjen fazlalığı nedeni ile) olmadığı ve PKOS gelişimi üzerine etkisinin olmadığı, CYP11B1 ve HSD3B2 gen değişimlerinin PKOS oluşumu üzerine etkisinin olmadığı, CYP11B1 üzerinde CYP11B2 kaynaklı değişimlerin (p.N335D) varlığı CYP11B1'e CYP11B2 fonksiyonu kazanımına yol açtığı, taşıyıcılık sıklığının yüksek olmasına rağmen homozigot değişime sahip bireylerin az olduğu, belirlenen CYP21A2 promotör gen konversiyon sıklığının (%11.7) yüksekliğinden dolayı NKAH tanısının konulmasında promotör bölgesinde göz önüne alınması gerektiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar PKOS vb androjen fazlalığı kaynaklı endokrin bozukluklarda androjen sentezi anomalilerden ziyade metabolizması üzerine olan etkilerin daha etkili olduğu yönündedir, diğer bir olasılık ise bu verilerin hastalara uygulanacak uzun süreli takip ile daha anlamlı bir verilere neden olabileceğidir. NKAH tanısının konulmasında sinakten testinin doğruluk yüzdesi düşük bulunmuştur. Tarama testi olarak kullanılabilir fakat, kesin tanının konulması için moleküler yöntemler ile konfirme edilmelidir. NKAH aday genlerde taşıyıcılık durumu ve gönüllü grubundaki 7/1000 sıklığı ile Türk kadın popülasyonu için nadir hastalıklar arasında yer almaması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Miller WL,Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. Endoc Rev 2011; 32: 81-151.
2. Simard J, Ricketts ML, Gingras S, et al. Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. Endoc Rev 2005; 26: 525-582.
3. Hershkovitz E, Parvari R, Wudy SA, et al. Homozygous mutation G539R in the gene for P450 oxidoreductase in a family previously diagnosed as having 17,20-lyase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93: 3584-3588.
4. Riedl S, Nguyen HH, Clausmeyer S, et al. A homozygous L299P mutation in the CYP11B1 gene leads to complete virilization in 46,XX individuals with 11-beta-hydroxylase deficiency. Horm Res 2008; 70: 145-149.
5. Van Nieuwerburgh F, Stoop D, Cabri P, et al. Shorter CAG repeats in the androgen receptor gene may enhance hyperandrogenicity in polycystic ovary syndrome. Gynecol Endocrinol 2008; 24: 669-673.
6. Witherspoon DJ, Wooding S, Rogers AR, et al. Genetic similarities within and between human populations. Genetics 2007; 176: 351-359.
7. Gregory TR. Insertion-deletion biases and the evolution of genome size. Gene 2004; 324: 15-34.
8. Elgar G,Vavouri T. Tuning in to the signals: noncoding sequence conservation in vertebrate genomes. Trends Genet 2008; 24: 344-352.
9. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature 2004; 431: 931-945.
10. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001; 409: 860-921.

11. Wong GK, Passey DA, Huang Y, et al. Is "junk" DNA mostly intron DNA? Genome Res 2000; 10: 1672-1678.
12. Wong GK, Passey DA, Yu J. Most of the human genome is transcribed. Genome Res 2001; 11: 1975-1977.
13. Vinogradov AE. Intron-genome size relationship on a large evolutionary scale. J Mol Evol 1999; 49: 376-384.
14. Harrison PM, Hegyi H, Balasubramanian S, et al. Molecular fossils in the human genome: identification and analysis of the pseudogenes in chromosomes 21 and 22. Genome Res 2002; 12: 272-280.
15. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. Science 2000; 291: 1304-1351.
16. Cheung J, Estivill X, Khaja R, et al. Genome-wide detection of segmental duplications and potential assembly errors in the human genome sequence. Genome Biol 2003; 4: R25.
17. de Koning AP, Gu W, Castoe TA, et al. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. PLoS Genet 2011; 7: e1002384.
18. Cowley M,Oakey RJ. Transposable elements re-wire and fine-tune the transcriptome. PLoS Genet 2013; 9: e1003234.
19. Gregory TR. Synergy between sequence and size in large-scale genomics. Nat Rev Genet 2005; 6: 699-708.
20. Lupski JR,Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. PLoS Genet 2005; 1: e49.
21. Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. Trends Genet 1998; 14: 417-422.
22. Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. Cell 2002; 109 Suppl: 45-55.
23. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. Annu Rev Immunol 2008; 26: 261-292.
24. Savage JR. Interchange and intra-nuclear architecture. Environ Mol Mutagen 1993; 22: 234-244.

25. Mani RS,Chinnaiyan AM. Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences. Nat Rev Genet 2010; 11: 819-829.
26. Takatsuki H, Sadamura S, Umemura T, et al. PML/RAR alpha fusion gene is expressed in both granuloid/macrophage and erythroid colonies in acute promyelocytic leukaemia. Br J Haematol 1993; 85: 477-482.
27. Neves H, Ramos C, da Silva MG, et al. The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. Blood 1999; 93: 1197-1207.
28. Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, et al. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. Cell 1990; 60: 557-563.
29. Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, et al. Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. Science 2000; 290: 138-141.
30. Gandhi M, Medvedovic M, Stringer JR, et al. Interphase chromosome folding determines spatial proximity of genes participating in carcinogenic RET/PTC rearrangements. Oncogene 2006; 25: 2360-2366.
31. Osborne CS, Chakalova L, Brown KE, et al. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. Nat Genet 2004; 36: 1065-1071.
32. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. Science 2009; 326: 289-293.
33. Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. Nat Rev Cancer 2008; 8: 497-511.
34. Helgeson BE, Tomlins SA, Shah N, et al. Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 gene fusions in prostate cancer. Cancer Res 2008; 68: 73-80.
35. Lin C, Yang L, Tanasa B, et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. Cell 2009; 139: 1069-1083.

36. Parada LA, McQueen PG, Munson PJ, et al. Conservation of relative chromosome positioning in normal and cancer cells. Curr Biol 2002; 12: 1692-1697.
37. Gandhi M, Dillon LW, Pramanik S, et al. DNA breaks at fragile sites generate oncogenic RET/PTC rearrangements in human thyroid cells. Oncogene 2010; 29: 2272-2280.
38. Ames BN,Shigenaga MK. Oxidants are a major contributor to aging. Ann N Y Acad Sci 1992; 663: 85-96.
39. Barzilai A, Rotman G, Shiloh Y. ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. DNA Repair (Amst) 2002; 1: 3-25.
40. Aguilera A. The connection between transcription and genomic instability. Embo J 2002; 21: 195-201.
41. Tuduri S, Crabbe L, Conti C, et al. Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. Nat Cell Biol 2009; 11: 1315-1324.
42. Ju BG, Lunyak VV, Perissi V, et al. A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. Science 2006; 312: 1798-1802.
43. Haffner MC, Aryee MJ, Toubaji A, et al. Androgen-induced TOP2B-mediated double-strand breaks and prostate cancer gene rearrangements. Nat Genet 2010; 42: 668-675.
44. Binaschi M, Borgnetto ME, Capranico G. Loss of drug-stimulated topoisomerase II DNA breaks in living cells is different at two unrelated loci. Nucleic Acids Res 2000; 28: 3289-3293.
45. Zhang Y,Rowley JD. Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. DNA Repair (Amst) 2006; 5: 1282-1297.
46. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. Annu Rev Biochem 2010; 79: 181-211.
47. Richardson C,Jasin M. Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. Nature 2000; 405: 697-700.

48. Simsek D,Jasin M. Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. Nature Struct Mol Biol 2010; 17: 410-416.
49. Boboila C, Jankovic M, Yan CT, et al. Alternative end-joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 3034-3039.
50. Yan CT, Boboila C, Souza EK, et al. IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. Nature 2007; 449: 478-482.
51. Boboila C, Yan C, Wesemann DR, et al. Alternative end-joining catalyzes class switch recombination in the absence of both Ku70 and DNA ligase 4. J Exp Med 2010; 207: 417-427.
52. Moynahan ME,Jasin M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 2010; 11: 196-207.
53. Sasaki M, Lange J, Keeney S. Genome destabilization by homologous recombination in the germ line. Nat Rev Mol Cell Biol 2010; 11: 182-195.
54. Stankiewicz P,Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. Trends Genet 2002; 18: 74-82.
55. Durkin SG,Glover TW. Chromosome fragile sites. Annu Rev Genet 2007; 41: 169-192.
56. Arlt MF, Durkin SG, Ragland RL, et al. Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. DNA Repair (Amst) 2006; 5: 1126-1135.
57. Wells RD. Non-B DNA conformations, mutagenesis and disease. Trends Biochem Sci 2007; 32: 271-278.
58. Raghavan SC,Lieber MR. DNA structures at chromosomal translocation sites. Bioessays 2006; 28: 480-494.
59. Tsai AG, Lu H, Raghavan SC, et al. Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity. Cell 2008; 135: 1130-1142.
60. Iskow RC, McCabe MT, Mills RE, et al. Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. Cell 2010; 141: 1253-1261.
61. Huang CR, Schneider AM, Lu Y, et al. Mobile interspersed repeats are major structural variants in the human genome. Cell 2010; 141: 1171-1182.

62. Beck CR, Collier P, Macfarlane C, et al. LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. Cell 2010; 141: 1159-1170.
63. Ewing AD,Kazazian HH, Jr. High-throughput sequencing reveals extensive variation in human-specific L1 content in individual human genomes. Genome Res 2010; 20: 1262-1270.
64. Liu Y, Subrahmanyam R, Chakraborty T, et al. A plant homeodomain in RAG-2 that binds Hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement. Immunity 2007; 27: 561-571.
65. Matthews AG, Kuo AJ, Ramon-Maiques S, et al. RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. Nature 2007; 450: 1106-1110.
66. Shimazaki N, Tsai AG, Lieber MR. H3K4me3 stimulates the V(D)J RAG complex for both nicking and hairpinning in trans in addition to tethering in cis: implications for translocations. Mol Cell 2009; 34: 535-544.
67. Cheung VG, Sherman SL, Feingold E. Genetics. Genetic control of hotspots. Science 2010; 327: 791-792.
68. Ng HH, Ciccone DN, Morshead KB, et al. Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 1820-1825.
69. Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, et al. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. Hum Genet 2013; 132: 1077-1130.
70. Vytopil M, Ricci E, Dello Russo A, et al. Frequent low penetrance mutations in the Lamin A/C gene, causing Emery Dreifuss muscular dystrophy. Neuromuscul Disord 2002; 12: 958-963.
71. Hung CC, Lin SY, Lee CN, et al. Low penetrance of retinoblastoma for p.V654L mutation of the RB1 gene. BMC Med Genet 2011; 12: 76.
72. Collins AL, Lunt PW, Garrett C, et al. Holoprosencephaly: a family showing dominant inheritance and variable expression. J Med Genet 1993; 30: 36-40.

73. Xue Y, Chen Y, Ayub Q, et al. Deleterious- and disease-allele prevalence in healthy individuals: insights from current predictions, mutation databases, and population-scale resequencing. Am J Hum Genet 2012; 91: 1022-1032.
74. Lee JM, Ramos EM, Lee JH, et al. CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. Neurology 2012; 78: 690-695.
75. Vogel F MA, Motulsky AG. Gene Action: Genetic Diseases, In: Human genetics: Problems and approaches (3rd), Springer, 1997: p257-361.
76. Plassart-Schiess E, Gervais A, Eymard B, et al. Novel muscle chloride channel (CLCN1) mutations in myotonia congenita with various modes of inheritance including incomplete dominance and penetrance. Neurology 1998; 50: 1176-1179.
77. Arzel-Hezode M, Sternberg D, Tabti N, et al. Homozygosity for dominant mutations increases severity of muscle channelopathies. Muscle Nerve 2010; 41: 470-477.
78. Shalata A, Furman H, Adir V, et al. Myotonia congenita in a large consanguineous Arab family: insight into the clinical spectrum of carriers and double heterozygotes of a novel mutation in the chloride channel CLCN1 gene. Muscle Nerve 2010; 41: 464-469.
79. Beutler E. The HFE Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis. Blood 2003; 101: 3347-3350.
80. Weiss G. Genetic mechanisms and modifying factors in hereditary hemochromatosis. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010; 7: 50-58.
81. Rochette J, Le Gac G, Lassoued K, et al. Factors influencing disease phenotype and penetrance in HFE haemochromatosis. Hum Genet 2010; 128: 233-248.
82. McCune CA, Ravine D, Carter K, et al. Iron loading and morbidity among relatives of HFE C282Y homozygotes identified either by population genetic testing or presenting as patients. Gut 2006; 55: 554-562.
83. Whitlock EP, Garlitz BA, Harris EL, et al. Screening for hereditary hemochromatosis: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med 2006; 145: 209-223.
84. Rossi E, Olynyk JK, Jeffrey GP. Clinical penetrance of C282Y homozygous HFE hemochromatosis. Expert Rev Hematol 2008; 1: 205-216.

85. Thauvin-Robinet C, Munck A, Huet F, et al. The very low penetrance of cystic fibrosis for the R117H mutation: a reappraisal for genetic counselling and newborn screening. J Med Genet 2009; 46: 752-758.
86. Arnold WV,Fertala A. Skeletal diseases caused by mutations that affect collagen structure and function. Int J Biochem Cell Biol 2013; 45: 1556-1567.
87. Austin ED, Phillips JA, Cogan JD, et al. Truncating and missense BMPR2 mutations differentially affect the severity of heritable pulmonary arterial hypertension. Respir Res 2009; 10: 87.
88. Bolk S, Pelet A, Hofstra RM, et al. A human model for multigenic inheritance: phenotypic expression in Hirschsprung disease requires both the RET gene and a new 9q31 locus. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 268-273.
89. Cheng WC, Shu WY, Li CY, et al. Intra- and inter-individual variance of gene expression in clinical studies. PLoS One 2012; 7: e38650.
90. Tripathi S, Schultz I, Becker E, et al. Unequal allelic expression of wild-type and mutated beta-myosin in familial hypertrophic cardiomyopathy. Basic Res Cardiol 2011; 106: 1041-1055.
91. MacArthur DG, Balasubramanian S, Frankish A, et al. A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes. Science 2012; 335: 823-828.
92. Zhang W, Bleibel WK, Roe CA, et al. Gender-specific differences in expression in human lymphoblastoid cell lines. Pharmacogenet Genomics 2007; 17: 447-450.
93. Solter D. Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes. Annu Rev Genet 1988; 22: 127-146.
94. DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. Cell 1991; 64: 849-859.
95. Giannoukakis N, Deal C, Paquette J, et al. Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene. Nat Genet 1993; 4: 98-101.
96. Barlow DP. Gametic imprinting in mammals. Science 1995; 270: 1610-1613.
97. Morison IM,Reeve AE. A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals. Hum Mol Genet 1998; 7: 1599-1609.
98. Wolffe AP,Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. Science 1999; 286: 481-486.

99. Shirahama S, Miyahara A, Kitoh H, et al. Skewed X-chromosome inactivation causes intra-familial phenotypic variation of an EBP mutation in a family with X-linked dominant chondrodysplasia punctata. Hum Genet 2003; 112: 78-83.
100. Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM. Genetics and epigenetics of obesity. Maturitas 2011; 69: 41-49.
101. Hunter DJ. Gene-environment interactions in human diseases. Nat Rev Genet 2005; 6: 287-298.
102. Unger MA, Nathanson KL, Calzone K, et al. Screening for genomic rearrangements in families with breast and ovarian cancer identifies BRCA1 mutations previously missed by conformation-sensitive gel electrophoresis or sequencing. Am J Hum Genet 2000; 67: 841-850.
103. Al-Mulla F, Bland JM, Serratt D, et al. Age-dependent penetrance of different germline mutations in the BRCA1 gene. J Clin Pathol 2009; 62: 350-356.
104. Calore C, De Bortoli M, Romualdi C, et al. A founder MYBPC3 mutation results in HCM with a high risk of sudden death after the fourth decade of life. J Med Genet 2015; 52: 338-347.
105. Page SP, Kounas S, Syrris P, et al. Cardiac myosin binding protein-C mutations in families with hypertrophic cardiomyopathy: disease expression in relation to age, gender, and long term outcome. Circ Cardiovasc Genet 2012; 5: 156-166.
106. Stutzmann F, Tan K, Vatin V, et al. Prevalence of melanocortin-4 receptor deficiency in Europeans and their age-dependent penetrance in multigenerational pedigrees. Diabetes 2008; 57: 2511-2518.
107. Ruiz-Martinez J, Gorostidi A, Ibanez B, et al. Penetrance in Parkinson's disease related to the LRRK2 R1441G mutation in the Basque country (Spain). Mov Disord 2010; 25: 2340-2345.
108. Fearnhead NS, Wilding JL, Winney B, et al. Multiple rare variants in different genes account for multifactorial inherited susceptibility to colorectal adenomas. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 15992-15997.
109. Koren-Michowitz M, Friedman E, Gershoni-Baruch R, et al. Coinheritance of BRCA1 and BRCA2 mutations with Fanconi anemia and Bloom syndrome mutations in Ashkenazi Jewish population: possible role in risk modification for cancer development. Am J Hematol 2005; 78: 203-206.

110. Okkels H, Sunde L, Lindorff-Larsen K, et al. Polyposis and early cancer in a patient with low penetrant mutations in MSH6 and APC: hereditary colorectal cancer as a polygenic trait. Int J Colorectal Dis 2006; 21: 847-850.
111. Kury S, Buecher B, Robiou-du-Pont S, et al. Low-penetrance alleles predisposing to sporadic colorectal cancers: a French case-controlled genetic association study. Bmc Cancer 2008; 8: 326.
112. Wasielewski M, Riaz M, Vermeulen J, et al. Association of rare MSH6 variants with familial breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2010; 123: 315-320.
113. Martinez SL,Kolodner RD. Functional analysis of human mismatch repair gene mutations identifies weak alleles and polymorphisms capable of polygenic interactions. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 5070-5075.
114. Plon SE, Wheeler DA, Strong LC, et al. Identification of genetic susceptibility to childhood cancer through analysis of genes in parallel. Cancer Genet 2011; 204: 19-25.
115. Morak M, Massdorf T, Sykora H, et al. First evidence for digenic inheritance in hereditary colorectal cancer by mutations in the base excision repair genes. Eur J Cancer 2011; 47: 1046-1055.
116. Gracia-Aznarez FJ, Fernandez V, Pita G, et al. Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles. PLoS One 2013; 8: e55681.
117. van Blitterswijk M, van Es MA, Hennekam EA, et al. Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet 2012; 21: 3776-3784.
118. Maller J, George S, Purcell S, et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. Nat Genet 2006; 38: 1055-1059.
119. Marras C, Klein C, Lang AE, et al. LRRK2 and Parkin mutations in a family with parkinsonism-Lack of genotype-phenotype correlation. Neurobiol Aging 2010; 31: 721-722.
120. Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. Science 1994; 264: 1604-1608.

121. Gruber R, Wilson NJ, Smith FJ, et al. Increased pachyonychia congenita severity in patients with concurrent keratin and filaggrin mutations. Br J Dermatol 2009; 161: 1391-1395.
122. Serrano-Fernandez P, Debniak T, Gorski B, et al. Synergistic interaction of variants in CHEK2 and BRCA2 on breast cancer risk. Breast Cancer Res Treat 2009; 117: 161-165.
123. Ekvall S, Hagenas L, Allanson J, et al. Co-occurring SHOC2 and PTPN11 mutations in a patient with severe/complex Noonan syndrome-like phenotype. Am J Med Genet. Part A 2011; 155A: 1217-1224.
124. Agarwal S,Moorchung N. Modifier genes and oligogenic disease. J Nippon Med Sch 2005; 72: 326-334.
125. Nadeau JH. Modifier genes in mice and humans. Nat Rev Genet 2001; 2: 165-174.
126. Wolf U. Identical mutations and phenotypic variation. Hum Genet 1997; 100: 305-321.
127. Genin E, Feingold J, Clerget-Darpoux F. Identifying modifier genes of monogenic disease: strategies and difficulties. Hum Genet 2008; 124: 357-368.
128. Nadeau JH. Modifier genes and protective alleles in humans and mice. Curr Opin Genet Dev 2003; 13: 290-295.
129. Badano JL,Katsanis N. Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. Nat Rev Genet 2002; 3: 779-789.
130. Davies JC, Turner MW, Klein N. Impaired pulmonary status in cystic fibrosis adults with two mutated MBL-2 alleles. Eur Respir J 2004; 24: 798-804.
131. Frangolias DD, Ruan J, Wilcox PJ, et al. Alpha 1-antitrypsin deficiency alleles in cystic fibrosis lung disease. Am J Respir Cell Mol Biol 2003; 29: 390-396.
132. Buscher R, Eilmes KJ, Grasemann H, et al. beta2 adrenoceptor gene polymorphisms in cystic fibrosis lung disease. Pharmacogenetics 2002; 12: 347-353.
133. Baranov VS, Ivaschenko T, Bakay B, et al. Proportion of the GSTM1 0/0 genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial diseases. Hum Genet 1996; 97: 516-520.

134. Grasemann H, Storm van's Gravesande K, Buscher R, et al. Endothelial nitric oxide synthase variants in cystic fibrosis lung disease. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167: 390-394.
135. McKone EF, Shao J, Frangolias DD, et al. Variants in the glutamate-cysteine-ligase gene are associated with cystic fibrosis lung disease. Am J Respir Crit Care Med 2006; 174: 415-419.
136. Charlesworth D,Willis JH. The genetics of inbreeding depression. Nat Rev Genet 2009; 10: 783-796.
137. Cholera R, Brittain NJ, Gillrie MR, et al. Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105: 991-996.
138. Mason JI, Rainey WE. Steroidogenesis in the human fetal adrenal: a role for cholesterol synthesized de novo. J Clin Endocrinol Metab 1987; 64: 140-147.
139. Gwynne JT, Strauss JF, 3rd. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. Endocr Rev 1982; 3: 299-329.
140. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest 2002; 109: 1125-1131.
141. Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. Recent Prog Horm Res 1979; 35: 215-257.
142. Kraemer FB. Adrenal cholesterol utilization. Mol Cel Endocr 2007; 265-266: 42-45.
143. Chang TY, Chang CC, Ohgami N, et al. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. Annu Rev Cell Dev Biol 2006; 22: 129-157.
144. Miller WL. StAR search--what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import. Mol Endocrinol 2007; 21: 589-601.
145. Ponting CP, Aravind L. START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. Trends Biochem Sci 1999; 24: 130-132.
146. Soccio RE, Breslow JL. StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism. J Biol Chem 2003; 278: 22183-22186.

147. Haberland ME, Reynolds JA. Self-association of cholesterol in aqueous solution. Proc Natl Acad Sci U S A 1973; 70: 2313-2316.

148. Soccio RE, Breslow JL. Intracellular cholesterol transport. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 1150-1160.

149. Soccio RE, Adams RM, Romanowski MJ, et al. The cholesterol-regulated StarD4 gene encodes a StAR-related lipid transfer protein with two closely related homologues, StarD5 and StarD6. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 6943-6948.

150. Tsujishita Y, Hurley JH. Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. Nat Struct Biol 2000; 7: 408-414.

151. Waterham HR. Defects of cholesterol biosynthesis. FEBS letters 2006; 580: 5442-5449.

152. Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. Endocr Rev 1988; 9: 295-318.

153. Mulatero P, Curnow KM, Aupetit-Faisant B, et al. Recombinant CYP11B genes encode enzymes that can catalyze conversion of 11-deoxycortisol to cortisol, 18-hydroxycortisol, and 18-oxocortisol. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 3996-4001.

154. Suzuki T, Sasano H, Takeyama J, et al. Developmental changes in steroidogenic enzymes in human postnatal adrenal cortex: immunohistochemical studies. Clin Endocrinol 2000; 53: 739-747.

155. Kater CE, Biglieri EG. Disorders of steroid 17 alpha-hydroxylase deficiency. Endocrinol Metab Clin North Am 1994; 23: 341-357.

156. Auchus RJ, Lee TC, Miller WL. Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. J Biol Chem 1998; 273: 3158-3165.

157. Auchus RJ, Rainey WE. Adrenarche - physiology, biochemistry and human disease. Clin Endocrinol 2004; 60: 288-296.

158. Miller WL. The molecular basis of premature adrenarche: an hypothesis. Acta Paediatr Suppl 1999; 88: 60-66.

159. Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, et al. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. J Clin Endocrinol Metab 1984; 59: 551-555.

160. Auchus RJ, Geller DH, Lee TC, et al. The regulation of human P450c17 activity: relationship to premature adrenarche, insulin resistance and the polycystic ovary syndrome. Trends Endocrinol Metab 1998; 9: 47-50.

161. Ibanez L, Potau N, Virdis R, et al. Postpubertal outcome in girls diagnosed of premature pubarche during childhood: increased frequency of functional ovarian hyperandrogenism. J Clin Endocrinol Metab 1993; 76: 1599-1603.

162. Oppenheimer E, Linder B, DiMartino-Nardi J. Decreased insulin sensitivity in prepubertal girls with premature adrenarche and acanthosis nigricans. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80: 614-618.

163. Ibanez L, Potau N, Zampolli M, et al. Hyperinsulinemia in postpubertal girls with a history of premature pubarche and functional ovarian hyperandrogenism. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 1237-1243.

164. Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL. Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. Endocr Rev 1995; 16: 322-353.

165. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. Endocr Rev 1997; 18: 774-800.

166. Bollag GE, Roth RA, Beaudoin J, et al. Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity. Proc Natl Acad Sci U S A 1986; 83: 5822-5824.

167. Stadtmauer L, Rosen OM. Increasing the cAMP content of IM-9 cells alters the phosphorylation state and protein kinase activity of the insulin receptor. J Biol Chem 1986; 261: 3402-3407.

168. Takayama S, White MF, Kahn CR. Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. J Biol Chem 1988; 263: 3440-3447.

169. Zhang LH, Rodriguez H, Ohno S, et al. Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 10619-10623.

170. Pandey AV, Mellon SH, Miller WL. Protein phosphatase 2A and phosphoprotein SET regulate androgen production by P450c17. J Biol Chem 2003; 278: 2837-2844.

171. Voutilainen R, Tapanainen J, Chung BC, et al. Hormonal regulation of P450scc (20,22-desmolase) and P450c17 (17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human granulosa cells. J Clin Endocr Metab 1986; 63: 202-207.

172. McNatty KP, Moore LG, Hudson NL, et al. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. Reproduction 2004; 128: 379-386.

173. Voutilainen R, Miller WL. Coordinate tropic hormone regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and the cholesterol side-chain-cleavage enzyme, P450scc [corrected], in human steroidogenic tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84: 1590-1594.

174. Dor J, Ben-Shlomo I, Lunenfeld B, et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) may not be essential for ovarian follicular development: evidence from IGF-I deficiency. J Clin Endocr Metab 1992; 74: 539-542.

175. Welt CK, Smith ZA, Pauler DK, et al. Differential regulation of inhibin A and inhibin B by luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and stage of follicle development. J Clin Endocr Metab 2001; 86: 2531-2537.

176. Compagnone NA, Mellon SH. Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 4678-4683.

177. Chiang EF, Yan YL, Guiguen Y, et al. Two Cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. Mol Biol Evol 2001; 18: 542-550.

178. Ghoumari AM, Ibanez C, El-Etr M, et al. Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. J Neurochem 2003; 86: 848-859.

179. Ghoumari AM, Baulieu EE, Schumacher M. Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. Neuroscience 2005; 135: 47-58.

180. Karishma KK, Herbert J. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. Eur J Neurosci 2002; 16: 445-453.

181. Keller AF, Breton JD, Schlichter R, et al. Production of 5alpha-reduced neurosteroids is developmentally regulated and shapes GABA(A) miniature IPSCs in lamina II of the spinal cord. J Neurosci 2004; 24: 907-915.
182. Martignoni E, Costa A, Sinforiani E, et al. The brain as a target for adrenocortical steroids: cognitive implications. Psychoneuroendocrinology 1992; 17: 343-354.
183. McEwen BS. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. Trends Pharmacol Sci 1991; 12: 141-147.
184. McEwen BS. Steroid hormone actions on the brain: when is the genome involved? Horm Behav 1994; 28: 396-405.
185. McEwen BS. Steroid hormones: effect on brain development and function. Horm Res 1992; 37 Suppl 3: 1-10.
186. Pignataro L, Lerner AA, Baranao JL, et al. Biosynthesis of progesterone derived neurosteroids by developing avian CNS: in vitro effects on the GABAA receptor complex. Int J Dev Neurosci 1998; 16: 433-441.
187. Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K. Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. J Neurosci 2001; 21: 6221-6232.
188. Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K. Dendritic spine formation in response to progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell in rats. Neurosci Lett 2002; 322: 111-115.
189. Suzuki M, Wright LS, Marwah P, et al. Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 3202-3207.
190. Wang JM, Johnston PB, Ball BG, et al. The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. J Neurosci 2005; 25: 4706-4718.
191. Charalampopoulos I, Tsatsanis C, Dermitzaki E, et al. Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 8209-8214.
192. Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Vardouli L, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate and allopregnanolone directly stimulate catecholamine production via

induction of tyrosine hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization. Endocrinology 2005; 146: 3309-3318.

193. Charalampopoulos I, Alexaki VI, Tsatsanis C, et al. Neurosteroids as endogenous inhibitors of neuronal cell apoptosis in aging. Ann N Y Acad Sci 2006; 1088: 139-152.
194. Dhandapani KM,Brann DW. Protective effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the brain. Biol Reprod 2002; 67: 1379-1385.
195. Garcia-Ovejero D, Azcoitia I, Doncarlos LL, et al. Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. Brain Res Brain Res Rev 2005; 48: 273-286.
196. Green PS, Bishop J, Simpkins JW. 17 alpha-estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. J Neurosci 1997; 17: 511-515.
197. Kimonides VG, Khatibi NH, Svendsen CN, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 1852-1857.
198. Lapchak PA, Araujo DM. Preclinical development of neurosteroids as neuroprotective agents for the treatment of neurodegenerative diseases. Int Rev Neurobiol 2001; 46: 379-397.
199. McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. Brain Res 2000; 886: 172-189.
200. Melcangi RC, Panzica GC. Neuroactive steroids: old players in a new game. Neuroscience 2006; 138: 733-739.
201. Sapolsky RM. Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. Exp Gerontol 1999; 34: 721-732.
202. Schumacher M, Akwa Y, Guennoun R, et al. Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. J Neurocytol 2000; 29: 307-326.
203. Seckl JR. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? Front Neuroendocrinol 1997; 18: 49-99.
204. Singh M. Progesterone-induced neuroprotection. Endocrine 2006; 29: 271-274.
205. Singh M. Progestins and neuroprotection: are all progestins created equal? Minerva Endocrinol 2007; 32: 95-102.

206. Singh M, Sumien N, Kyser C, et al. Estrogens and progesterone as neuroprotectants: what animal models teach us. Front Biosci 2008; 13: 1083-1089.

207. Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, et al. Minireview: neuroprotective effects of estrogen-new insights into mechanisms of action. Endocrinology 2001; 142: 969-973.

208. Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, et al. Estrogens: trophic and protective factors in the adult brain. Front Neuroendocrinol 2001; 22: 33-66.

209. Wise PM, Dubal DB, Rau SW, et al. Are estrogens protective or risk factors in brain injury and neurodegeneration? Reevaluation after the Women's health initiative. Endocr Rev 2005; 26: 308-312.

210. Bauer HC, Bauer H. Micromethod for the determination of 3-beta-HSD activity in cultured cells. J Steroid Biochem 1989; 33: 643-646.

211. Corpechot C, Robel P, Axelson M, et al. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A 1981; 78: 4704-4707.

212. Corpechot C, Synguelakis M, Talha S, et al. Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. Brain Res 1983; 270: 119-125.

213. Cheney DL, Uzunov D, Costa E, et al. Gas chromatographic-mass fragmentographic quantitation of 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one (allopregnanolone) and its precursors in blood and brain of adrenalectomized and castrated rats. J Neurosci 1995; 15: 4641-4650.

214. Robel P, Synguelakis M, Halberg F, et al. [Persistence of the circadian rhythm of dehydroepiandrosterone in the brain, but not in the plasma, of castrated and adrenalectomized rats]. C R Acad Sci III 1986; 303: 235-238.

215. Robel P,Baulieu EE. Neuro-steroids: 3?-hydroxy-?(5)-derivatives in the rodent brain. Neurochem Int 1985; 7: 953-958.

216. Robel P,Baulieu EE. Neurosteroids Biosynthesis and function. Trends Endocr Metab 1994; 5: 1-8.

217. Baulieu EE. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. Recent Prog Horm Res 1997; 52: 1-32.

218. Baulieu EE. Neurosteroids: a novel function of the brain. Psychoneuroendocrinology 1998; 23: 963-987.

219. Mellon SH, Vaudry H. Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis. Int Rev Neurobiol 2001; 46: 33-78.

220. Mellon SH, Griffin LD. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. Trends Endocr Metab 2002; 13: 35-43.

221. Mensah-Nyagan AG, Feuilloley M, Dupont E, et al. Immunocytochemical localization and biological activity of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the central nervous system of the frog. J Neurosci 1994; 14: 7306-7318.

222. Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Feuilloley M, et al. In vivo and in vitro evidence for the biosynthesis of testosterone in the telencephalon of the female frog. J Neurochem 1996; 67: 413-422.

223. Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, et al. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. Pharmacol Rev 1999; 51: 63-81.

224. Morfin R, Courchay G. Pregnenolone and dehydroepiandrosterone as precursors of native 7-hydroxylated metabolites which increase the immune response in mice. J Ssteroid Biochem Mol Biol 1994; 50: 91-100.

225. Mukai H, Tsurugizawa T, Ogiue-Ikeda M, et al. Local neurosteroid production in the hippocampus: influence on synaptic plasticity of memory. Neuroendocrinology 2006; 84: 255-263.

226. Robel P, Bourreau E, Corpechot C, et al. Neuro-steroids: 3 beta-hydroxy-delta 5-derivatives in rat and monkey brain. J Steroid Biochem 1987; 27: 649-655.

227. Stapleton G, Steel M, Richardson M, et al. A novel cytochrome P450 expressed primarily in brain. J Biol Chem 1995; 270: 29739-29745.

228. Takase M, Ukena K, Yamazaki T, et al. Pregnenolone, pregnenolone sulfate, and cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the amphibian brain and their seasonal changes. Endocrinology 1999; 140: 1936-1944.

229. Ukena K, Usui M, Kohchi C, et al. Cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the cerebellar Purkinje neuron and its neonatal change in rats. Endocrinology 1998; 139: 137-147.

230. Beaujean D, Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, et al. Immunocytochemical localization and biological activity of hydroxysteroid sulfotransferase in the frog brain. J Neurochem 1999; 72: 848-857.

231. Compagnone NA, Mellon SH. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. Front Neuroendocrinol 2000; 21: 1-56.

232. Do Rego JL, Tremblay Y, Luu-The V, et al. Immunohistochemical localization and biological activity of the steroidogenic enzyme cytochrome P450 17alpha-hydroxylase/C17, 20-lyase (P450C17) in the frog brain and pituitary. J Neurochem 2007; 100: 251-268.

233. Inai Y, Nagai K, Ukena K, et al. Seasonal changes in neurosteroid concentrations in the amphibian brain and environmental factors regulating their changes. Brain Res 2003; 959: 214-225.

234. Jung-Testas I, Hu ZY, Baulieu EE, et al. Neurosteroids: biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. Endocrinology 1989; 125: 2083-2091.

235. Matsunaga M, Ukena K, Tsutsui K. Androgen biosynthesis in the quail brain. Brain Res 2002; 948: 180-185.

236. Matsunaga M, Okuhara K, Ukena K, et al. Identification of 3beta,5beta-tetrahydroprogesterone, a progesterone metabolite, and its stimulatory action on preoptic neurons in the avian brain. Brain Res 2004; 1007: 160-166.

237. Matsunaga M, Ukena K, Baulieu EE, et al. 7alpha-Hydroxypregnenolone acts as a neuronal activator to stimulate locomotor activity of breeding newts by means of the dopaminergic system. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 17282-17287.

238. Tsutsui K,Yamazaki T. Avian neurosteroids. I. Pregnenolone biosynthesis in the quail brain. Brain Res 1995; 678: 1-9.

239. Tsutsui K, Ukena K, Takase M, et al. Neurosteroid biosynthesis in vertebrate brains. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 1999; 124: 121-129.

240. Tsutsui K, Ukena K, Usui M, et al. Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. Neurosci Res 2000; 36: 261-273.

241. Tsutsui K, Inoue K, Miyabara H, et al. 7Alpha-hydroxypregnenolone mediates melatonin action underlying diurnal locomotor rhythms. J Neurosci 2008; 28: 2158-2167.

242. Ukena K, Kohchi C, Tsutsui K. Expression and activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. Endocrinology 1999; 140: 805-813.

243. Belelli D, Herd MB, Mitchell EA, et al. Neuroactive steroids and inhibitory neurotransmission: mechanisms of action and physiological relevance. Neuroscience 2006; 138: 821-829.

244. Majewska MD. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. Prog Neurobiol 1992; 38: 379-395.

245. Paul SM, Purdy RH. Neuroactive steroids. FASEB J 1992; 6: 2311-2322.

246. Strous RD, Maayan R, Weizman A. The relevance of neurosteroids to clinical psychiatry: from the laboratory to the bedside. Eur Neuropsychopharmacol 2006; 16: 155-169.

247. Belelli D, Lambert JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. Nat Rev Neurosci 2005; 6: 565-575.

248. Covey DF, Evers AS, Mennerick S, et al. Recent developments in structure-activity relationships for steroid modulators of GABA(A) receptors. Brain Res Brain Res Rev 2001; 37: 91-97.

249. Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, et al. Neurosteroid modulation of GABAA receptors. Prog Neurobiol 2003; 71: 67-80.

250. Jang MK, Mierke DF, Russek SJ, et al. A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 8198-8203.

251. Kavaliers M, Hirst M. An octadecaneuropeptide (ODN) derived from diazepam binding inhibitor increases aggressive interactions in mice. Brain Res 1986; 383: 343-349.

252. Mathis C, Paul SM, Crawley JN. The neurosteroid pregnenolone sulfate blocks NMDA antagonist-induced deficits in a passive avoidance memory task. Psychopharmacology 1994; 116: 201-206.

253. Mathis C, Vogel E, Cagniard B, et al. The neurosteroid pregnenolone sulfate blocks deficits induced by a competitive NMDA antagonist in active avoidance and lever-press learning tasks in mice. Neuropharmacology 1996; 35: 1057-1064.

254. Mellon SH. Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance. J Clin Endocr Metab 1994; 78: 1003-1008.

255. Monnet FP, Maurice T. The sigma1 protein as a target for the non-genomic effects of neuro(active)steroids: molecular, physiological, and behavioral aspects. J Pharmacol Sci 2006; 100: 93-118.

256. Costa ET, Soto EE, Cardoso RA, et al. Acute effects of ethanol on kainate receptors in cultured hippocampal neurons. Alcohol Clin Exp Res 2000; 24: 220-225.

257. Dubrovsky BO. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2005; 29: 169-192.

258. Rupprecht R, di Michele F, Hermann B, et al. Neuroactive steroids: molecular mechanisms of action and implications for neuropsychopharmacology. Brain Res Brain Res Rev 2001; 37: 59-67.

259. Rupprecht R, Holsboer F. Neuroactive steroids in neuropsychopharmacology. Int Rev Neurobiol 2001; 46: 461-477.

260. Maurice T, Roman FJ, Privat A. Modulation by neurosteroids of the in vivo (+)-[3H]SKF-10,047 binding to sigma 1 receptors in the mouse forebrain. J Neurosci Res 1996; 46: 734-743.

261. Maurice T, Phan VL, Urani A, et al. Neuroactive neurosteroids as endogenous effectors for the sigma1 (sigma1) receptor: pharmacological evidence and therapeutic opportunities. Jpn J Pharmacol 1999; 81: 125-155.

262. Maurice T, Gregoire C, Espallergues J. Neuro(active)steroids actions at the neuromodulatory sigma1 (sigma1) receptor: biochemical and physiological evidences, consequences in neuroprotection. Pharmacol Biochem Behav 2006; 84: 581-597.

263. Monnet FP, Mahe V, Robel P, et al. Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 3774-3778.

264. Strous RD. Dehydroepiandrosterone (DHEA) augmentation in the management of schizophrenia symptomatology. Essent Psychopharmacol 2005; 6: 141-147.

265. Takebayashi M, Hayashi T, Su TP. A perspective on the new mechanism of antidepressants: neuritogenesis through sigma-1 receptors. Pharmacopsychiatry 2004; 37 Suppl 3: 208-213.

266. Urani A, Privat A, Maurice T. The modulation by neurosteroids of the scopolamine-induced learning impairment in mice involves an interaction with sigma1 (sigma1) receptors. Brain Res 1998; 799: 64-77.

267. Belelli D, Pistis M, Peters JA, et al. The interaction of general anaesthetics and neurosteroids with GABA(A) and glycine receptors. Neurochem Int 1999; 34: 447-452.

268. Biro T, Maksay G. Allosteric modulation of glycine receptors is more efficacious for partial rather than full agonists. Neurochem Int 2004; 44: 521-527.

269. Jiang P, Yang CX, Wang YT, et al. Mechanisms of modulation of pregnanolone on glycinergic response in cultured spinal dorsal horn neurons of rat. Neuroscience 2006; 141: 2041-2050.

270. Maksay G, Laube B, Betz H. Subunit-specific modulation of glycine receptors by neurosteroids. Neuropharmacology 2001; 41: 369-376.

271. Mitchell EA, Gentet LJ, Dempster J, et al. GABAA and glycine receptor-mediated transmission in rat lamina II neurones: relevance to the analgesic actions of neuroactive steroids. J Physiol 2007; 583: 1021-1040.

272. Wu FS, Gibbs TT, Farb DH. Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. Mol Pharmacol 1991; 40: 333-336.

273. Kostowski W, Bienkowski P. Discriminative stimulus effects of ethanol: neuropharmacological characterization. Alcohol 1999; 17: 63-80.

274. Shannon EE, Purdy RH, Grant KA. Discriminative stimulus effects of 5.6 mg/kg pregnanolone in DBA/2J and C57BL/6J inbred mice. Alcohol 2005; 37: 35-45.

275. Shannon EE, Porcu P, Purdy RH, et al. Characterization of the discriminative stimulus effects of the neuroactive steroid pregnanolone in DBA/2J and C57BL/6J inbred mice. J Pharmacol Exp Ther 2005; 314: 675-685.

276. Arias HR, Bhumireddy P, Bouzat C. Molecular mechanisms and binding site locations for noncompetitive antagonists of nicotinic acetylcholine receptors. Int J Biochem Cell Biol 2006; 38: 1254-1276.

277. Bullock AE, Clark AL, Grady SR, et al. Neurosteroids modulate nicotinic receptor function in mouse striatal and thalamic synaptosomes. J Neurochem 1997; 68: 2412-2423.

278. Paradiso K, Sabey K, Evers AS, et al. Steroid inhibition of rat neuronal nicotinic alpha4beta2 receptors expressed in HEK 293 cells. Mol Pharmacol 2000; 58: 341-351.

279. Pereira EF, Hilmas C, Santos MD, et al. Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. J Neurobiol 2002; 53: 479-500.

280. Valera S, Ballivet M, Bertrand D. Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 9949-9953.

281. Horishita T, Minami K, Uezono Y, et al. The effects of the neurosteroids: pregnenolone, progesterone and dehydroepiandrosterone on muscarinic receptor-induced responses in Xenopus oocytes expressing M1 and M3 receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2005; 371: 221-228.

282. Klangkalya B, Chan A. Inhibition of hypothalamic and pituitary muscarinic receptor binding by progesterone. Neuroendocrinology 1988; 47: 294-302.

283. Steffensen SC, Jones MD, Hales K, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate and estrone sulfate reduce GABA-recurrent inhibition in the hippocampus via muscarinic acetylcholine receptors. Hippocampus 2006; 16: 1080-1090.

284. ffrench-Mullen JM. Cortisol inhibition of calcium currents in guinea pig hippocampal CA1 neurons via G-protein-coupled activation of protein kinase C. J Neurosci 1995; 15: 903-911.

285. Haseroth K, Christ M, Falkenstein E, et al. Aldosterone- and progesterone-membrane-binding proteins: new concepts of nongenomic steroid action. Curr Protein Pept Sci 2000; 1: 385-401.

286. He LM, Zhang CG, Zhou Z, et al. Rapid inhibitory effects of corticosterone on calcium influx in rat dorsal root ganglion neurons. Neuroscience 2003; 116: 325-333.

287. Lou SJ, Chen YZ. The rapid inhibitory effect of glucocorticoid on cytosolic free Ca2+ increment induced by high extracellular K+ and its underlying mechanism in PC12 cells. Biochem Biophys Res Commun 1998; 244: 403-407.

288. Meyer DA, Carta M, Partridge LD, et al. Neurosteroids enhance spontaneous glutamate release in hippocampal neurons. Possible role of metabotropic sigma1-like receptors. J Biol Chem 2002; 277: 28725-28732.

289. Orchinik M, Murray TF, Franklin PH, et al. Guanyl nucleotides modulate binding to steroid receptors in neuronal membranes. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 3830-3834.

290. Schiess AR, Partridge LD. Pregnenolone sulfate acts through a G-protein-coupled sigma1-like receptor to enhance short term facilitation in adult hippocampal neurons. Eur J Pharmacol 2005; 518: 22-29.

291. Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. Endocrinology 2006; 147: 5549-5556.

292. Ueda H, Yoshida A, Tokuyama S, et al. Neurosteroids stimulate G protein-coupled sigma receptors in mouse brain synaptic membrane. Neurosci Res 2001; 41: 33-40.

293. Ueda H, Inoue M, Yoshida A, et al. Metabotropic neurosteroid/sigma-receptor involved in stimulation of nociceptor endings of mice. J Pharmacol Exp Ther 2001; 298: 703-710.

294. Zhu Y, Bond J, Thomas P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 2237-2242.

295. Zhu Y, Rice CD, Pang Y, et al. Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 2231-2236.

296. Grazzini E, Guillon G, Mouillac B, et al. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. Nature 1998; 392: 509-512.

297. Lipschitz DL, Crowley WR, Armstrong WE, et al. Neurochemical bases of plasticity in the magnocellular oxytocin system during gestation. Exp Neurol 2005; 196: 210-223.

298. Sullivan SD, Moenter SM. Neurosteroids alter gamma-aminobutyric acid postsynaptic currents in gonadotropin-releasing hormone neurons: a possible mechanism for direct steroidal control. Endocrinology 2003; 144: 4366-4375.

299. Torres JM,Ortega E. DHEA, PREG and their sulphate derivatives on plasma and brain after CRH and ACTH administration. Neurochem Res 2003; 28: 1187-1191.

300. Zwain IH, Arroyo A, Amato P, et al. A role for hypothalamic astrocytes in dehydroepiandrosterone and estradiol regulation of gonadotropin-releasing

hormone (GnRH) release by GnRH neurons. Neuroendocrinology 2002; 75: 375-383.

301. Iwata M, Muneoka KT, Shirayama Y, et al. A study of a dendritic marker, microtubule-associated protein 2 (MAP-2), in rats neonatally treated neurosteroids, pregnenolone and dehydroepiandrosterone (DHEA). Neurosci Lett 2005; 386: 145-149.
302. Laurine E, Lafitte D, Gregoire C, et al. Specific binding of dehydroepiandrosterone to the N terminus of the microtubule-associated protein MAP2. J Biol Chem 2003; 278: 29979-29986.
303. Murakami K, Fellous A, Baulieu EE, et al. Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 3579-3584.
304. Plassart-Schiess E, Baulieu EE. Neurosteroids: recent findings. Brain Res Brain Res Rev 2001; 37: 133-140.
305. Bloch M, Rubinow DR, Berlin K, et al. Monoamines and neurosteroids in sexual function during induced hypogonadism in healthy men. Arch Gen Psychiatry 2006; 63: 450-456.
306. Czlonkowska AI, Zienowicz M, Bidzinski A, et al. The role of neurosteroids in the anxiolytic, antidepressive- and anticonvulsive effects of selective serotonin reuptake inhibitors. Med Sci Mon 2003; 9: RA270-275.
307. Dubrovsky B. The specificity of stress responses to different nocuous stimuli: neurosteroids and depression. Brain Res Bull 2000; 51: 443-455.
308. Dubrovsky B. Neurosteroids, neuroactive steroids, and symptoms of affective disorders. Pharmacol Biochem Behav 2006; 84: 644-655.
309. Engel SR, Grant KA. Neurosteroids and behavior. Int Rev Neurobiol 2001; 46: 321-348.
310. Flood JF, Morley JE, Roberts E. Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 1567-1571.
311. Flood JF, Morley JE, Roberts E. Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: the amygdala is by far the most sensitive. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 10806-10810.

312. Guo AL, Petraglia F, Criscuolo M, et al. Evidence for a role of neurosteroids in modulation of diurnal changes and acute stress-induced corticosterone secretion in rats. Gynecol Endocrinol 1995; 9: 1-7.

313. Mayo W, Dellu F, Robel P, et al. Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis magnocellularis affects cognitive processes in the rat. Brain Res 1993; 607: 324-328.

314. Mayo W, George O, Darbra S, et al. Individual differences in cognitive aging: implication of pregnenolone sulfate. Prog Neurobiol 2003; 71: 43-48.

315. Mellon SH. Neurosteroid regulation of central nervous system development. Pharmacol Ther 2007; 116: 107-124.

316. Mellon SH, Gong W, Schonemann MD. Endogenous and synthetic neurosteroids in treatment of Niemann-Pick Type C disease. Brain Res Rev 2008; 57: 410-420.

317. Meziane H, Mathis C, Paul SM, et al. The neurosteroid pregnenolone sulfate reduces learning deficits induced by scopolamine and has promnestic effects in mice performing an appetitive learning task. Psychopharmacology 1996; 126: 323-330.

318. Mitchell EA, Herd MB, Gunn BG, et al. Neurosteroid modulation of GABAA receptors: molecular determinants and significance in health and disease. Neurochem Int 2008; 52: 588-595.

319. Pinna G, Agis-Balboa RC, Pibiri F, et al. Neurosteroid biosynthesis regulates sexually dimorphic fear and aggressive behavior in mice. Neurochem Res 2008; 33: 1990-2007.

320. Reddy DS. The clinical potentials of endogenous neurosteroids. Drugs Today 2002; 38: 465-485.

321. Schumacher M, Guennoun R, Robert F, et al. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. Growth Horm IGF Res 2004; 14 Suppl A: S18-33.

322. Stein DG. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? Trends Neurosci 2001; 24: 386-391.

323. Vallee M, Mayo W, Darnaudery M, et al. Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 14865-14870.

324. van Broekhoven F,Verkes RJ. Neurosteroids in depression: a review. Psychopharmacology 2003; 165: 97-110.

325. Inoue T, Akahira J, Suzuki T, et al. Progesterone production and actions in the human central nervous system and neurogenic tumors. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 5325-5331.

326. Kim HJ, Kim JE, Ha M, et al. Steroidogenic acute regulatory protein expression in the normal human brain and intracranial tumors. Brain Res 2003; 978: 245-249.

327. Nygren C, von Holst H, Mansson JE, et al. Increased levels of cholesterol esters in glioma tissue and surrounding areas of human brain. Br J Neurosurg 1997; 11: 216-220.

328. Beyenburg S, Stoffel-Wagner B, Watzka M, et al. Expression of cytochrome P450scc mRNA in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. Neuroreport 1999; 10: 3067-3070.

329. King SR, Manna PR, Ishii T, et al. An essential component in steroid synthesis, the steroidogenic acute regulatory protein, is expressed in discrete regions of the brain. J Neurosci 2002; 22: 10613-10620.

330. Watzka M, Bidlingmaier F, Schramm J, et al. Sex- and age-specific differences in human brain CYP11A1 mRNA expression. J Neuroendocrinol 1999; 11: 901-905.

331. Yu L, Romero DG, Gomez-Sanchez CE, et al. Steroidogenic enzyme gene expression in the human brain. Mol Cell Endocrinol 2002; 190: 9-17.

332. Goascogne C, Gouezou M, Robel P, et al. The cholesterol side-chain cleavage complex in human brain white matter. J Neuroendocrinol 1989; 1: 153-156.

333. Ficher M, Baker WW. In vitro progesteronematabolism by selected brain areas, pituitary gland and tests of the adult male cat. J Steroid Biochem 1978; 9: 203-208.

334. Beyenburg S, Watzka M, Blumcke I, et al. Expression of mRNAs encoding for 17beta-hydroxisteroid dehydrogenase isozymes 1, 2, 3 and 4 in epileptic human hippocampus. Epilepsy Res 2000; 41: 83-91.

335. Steckelbroeck S, Stoffel-Wagner B, Reichelt R, et al. Characterization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in brain tissue: testosterone formation in the human temporal lobe. J Neuroendocrinol 1999; 11: 457-464.

336. Steckelbroeck S, Watzka M, Stoffel-Wagner B, et al. Expression of the 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 mRNA in the human brain. Mol Cell Endocrinol 2001; 171: 165-168.

337. Steckelbroeck S, Watzka M, Reissinger A, et al. Characterisation of estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17beta-HSD) activity in the human brain. J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 86: 79-92.

338. Stoffel-Wagner B, Watzka M, Steckelbroeck S, et al. Expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 2, 3 and 4 in the human temporal lobe. J Endocrinol 1999; 160: 119-126.

339. Andersson S, Russell DW. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87: 3640-3644.

340. Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, et al. Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. Nature 1991; 354: 159-161.

341. Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V, et al. Structure of human type II 5 alpha-reductase gene. Endocrinology 1992; 131: 1571-1573.

342. Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. An Rev Biochem 1994; 63: 25-61.

343. Celotti F, Negri-Cesi P, Poletti A. Steroid metabolism in the mammalian brain: 5alpha-reduction and aromatization. Brain Res Bull 1997; 44: 365-375.

344. Normington K, Russell DW. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 alpha-reductase isozymes. Evidence for distinct physiological functions. J Biol Chem 1992; 267: 19548-19554.

345. Wilson JD, Griffin JE, Russell DW. Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. Endocr Rev 1993; 14: 577-593.

346. Dong E, Matsumoto K, Uzunova V, et al. Brain 5alpha-dihydroprogesterone and allopregnanolone synthesis in a mouse model of protracted social isolation. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 2849-2854.

347. Melcangi RC, Poletti A, Cavarretta I, et al. The 5alpha-reductase in the central nervous system: expression and modes of control. J Steroid Biochem Mol Biol 1998; 65: 295-299.

348. Stoffel-Wagner B. Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. Ann N Y Acad Sci 2003; 1007: 64-78.

349. Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, et al. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression. J Clin Invest 1993; 92: 903-910.

350. Torres JM, Ortega E. Differential regulation of steroid 5alpha-reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. FASEB J 2003; 17: 1428-1433.

351. Stoffel-Wagner B, Watzka M, Steckelbroeck S, et al. Expression of CYP19 (aromatase) mRNA in the human temporal lobe. Biochem Biophys Res Commun 1998; 244: 768-771.

352. Stoffel-Wagner B, Beyenburg S, Watzka M, et al. Expression of 5alpha-reductase and 3alpha-hydroxisteroid oxidoreductase in the hippocampus of patients with chronic temporal lobe epilepsy. Epilepsia 2000; 41: 140-147.

353. Griffin LD, Mellon SH. Selective serotonin reuptake inhibitors directly alter activity of neurosteroidogenic enzymes. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 13512-13517.

354. Wilson JD, Auchus RJ, Leihy MW, et al. 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol is formed in tammar wallaby pouch young testes by a pathway involving 5alpha-pregnane-3alpha,17alpha-diol-20-one as a key intermediate. Endocrinology 2003; 144: 575-580.

355. Auchus RJ. The backdoor pathway to dihydrotestosterone. Trends Endocrinol Metab 2004; 15: 432-438.

356. Arlt W, Walker EA, Draper N, et al. Congenital adrenal hyperplasia caused by mutant P450 oxidoreductase and human androgen synthesis: analytical study. Lancet 2004; 363: 2128-2135.

357. Fukami M, Hasegawa T, Horikawa R, et al. Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in three patients initially regarded as having 21-hydroxylase deficiency and/or aromatase deficiency: diagnostic value of urine steroid hormone analysis. Pediatr Res 2006; 59: 276-280.

358. Homma K, Hasegawa T, Nagai T, et al. Urine steroid hormone profile analysis in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: implication for the backdoor pathway to dihydrotestosterone. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 2643-2649.

359. Moisan AM, Ricketts ML, Tardy V, et al. New insight into the molecular basis of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: identification of eight

mutations in the HSD3B2 gene eleven patients from seven new families and comparison of the functional properties of twenty-five mutant enzymes. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 4410-4425.

360. Hanley NA, Arlt W. The human fetal adrenal cortex and the window of sexual differentiation. Trends Endocrinol Metab 2006; 17: 391-397.
361. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. Endocr Rev 1987; 8: 1-28.
362. Wilson JD. The role of androgens in male gender role behavior. Endocr Rev 1999; 20: 726-737.
363. Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. Clin Pharmacol Ther 2011; 89: 44-55.
364. Lokuge S, Frey BN, Foster JA, et al. The rapid effects of estrogen: a mini-review. Behav Pharmacol 2010; 21: 465-472.
365. Koochekpour S. Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. Asian J Androl 2010; 12: 639-657.
366. Blauer M, Vaalasti A, Pauli SL, et al. Location of androgen receptor in human skin. J Invest Dermatol 1991; 97: 264-268.
367. Oettel M, Hubler D, Patchev V. Selected aspects of endocrine pharmacology of the aging male. Exp Gerontol 2003; 38: 189-198.
368. Chen F, Knecht K, Birzin E, et al. Direct agonist/antagonist functions of dehydroepiandrosterone. Endocrinology 2005; 146: 4568-4576.
369. Pietras RJ, Szego CM. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. Nature 1977; 265: 69-72.
370. Pietras RJ, Szego CM. Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. Biochem J 1980; 191: 743-760.
371. Simoncini T, Genazzani AR. Non-genomic actions of sex steroid hormones. Eur J Endocrinol 2003; 148: 281-292.
372. Ali S, Coombes RC. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. Nat Rev Cancer 2002; 2: 101-112.
373. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, et al. Aromatase--a brief overview. Annu Rev Physiol 2002; 64: 93-127.

374. Bulun SE, Lin Z, Zhao H, et al. Regulation of aromatase expression in breast cancer tissue. Ann N Y Acad Sci 2009; 1155: 121-131.

375. Ahmad N, Kumar R. Steroid hormone receptors in cancer development: a target for cancer therapeutics. Cancer Lett 2011; 300: 1-9.

376. Kovacs WJ, Griffin JE, Weaver DD, et al. A mutation that causes lability of the androgen receptor under conditions that normally promote transformation to the DNA-binding state. J Clin Invest 1984; 73: 1095-1104.

377. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, et al. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. Nature 1991; 352: 77-79.

378. Hall PF. Cytochromes P-450 and the regulation of steroid synthesis. Steroids 1986; 48: 131-196.

379. Agarwal AK, Auchus RJ. Minireview: cellular redox state regulates hydroxysteroid dehydrogenase activity and intracellular hormone potency. Endocrinology 2005; 146: 2531-2538.

380. Penning TM. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. Endocr Rev 1997; 18: 281-305.

381. Gonzalez FJ. The molecular biology of cytochrome P450s. Pharmacol Rev 1988; 40: 243-288.

382. Miller WL. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. Endocrinology 2005; 146: 2544-2550.

383. Yamano S, Aoyama T, McBride OW, et al. Human NADPH-P450 oxidoreductase: complementary DNA cloning, sequence and vaccinia virus-mediated expression and localization of the CYPOR gene to chromosome 7. Mol Pharmacol 1989; 36: 83-88.

384. Wang M, Roberts DL, Paschke R, et al. Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 8411-8416.

385. Hasemann CA, Kurumbail RG, Boddupalli SS, et al. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. Structure 1995; 3: 41-62.

386. Geller DH, Auchus RJ, Miller WL. P450c17 mutations R347H and R358Q selectively disrupt 17,20-lyase activity by disrupting interactions with P450 oxidoreductase and cytochrome b5. Mol Endocrinol 1999; 13: 167-175.

387. Auchus RJ, Miller WL. Molecular modeling of human P450c17 (17alpha-hydroxylase/17,20-lyase): insights into reaction mechanisms and effects of mutations. Mol Endocrinol 1999; 13: 1169-1182.

388. Gomes LG, Huang N, Agrawal V, et al. The common P450 oxidoreductase variant A503V is not a modifier gene for 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93: 2913-2916.

389. Solish SB, Picado-Leonard J, Morel Y, et al. Human adrenodoxin reductase: two mRNAs encoded by a single gene on chromosome 17cen----q25 are expressed in steroidogenic tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85: 7104-7108.

390. Lin D, Shi YF, Miller WL. Cloning and sequence of the human adrenodoxin reductase gene. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87: 8516-8520.

391. Chang CY, Wu DA, Lai CC, et al. Cloning and structure of the human adrenodoxin gene. DNA 1988; 7: 609-615.

392. Picado-Leonard J, Voutilainen R, Kao LC, et al. Human adrenodoxin: cloning of three cDNAs and cycloheximide enhancement in JEG-3 cells. J Biol Chem 1988; 263: 3240-3244.

393. Brentano ST, Black SM, Lin D, et al. cAMP post-transcriptionally diminishes the abundance of adrenodoxin reductase mRNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 4099-4103.

394. Sherbet DP, Papari-Zareei M, Khan N, et al. Cofactors, redox state, and directional preferences of hydroxysteroid dehydrogenases. Mol Cell Endocrinol 2007; 265-266: 83-88.

395. Papari-Zareei M, Brandmaier A, Auchus RJ. Arginine 276 controls the directional preference of AKR1C9 (rat liver 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase) in human embryonic kidney 293 cells. Endocrinology 2006; 147: 1591-1597.

396. Sherbet DP, Guryev OL, Papari-Zareei M, et al. Biochemical factors governing the steady-state estrone/estradiol ratios catalyzed by human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases types 1 and 2 in HEK-293 cells. Endocrinology 2009; 150: 4154-4162.

397. Carroll MC, Campbell RD, Porter RR. Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major

histocompatibility complex in man. Proc Natl Acad Sci U S A 1985; 82: 521-525.

398. White PC, Grossberger D, Onufer BJ, et al. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. Proc Natl Acad Sci U S A 1985; 82: 1089-1093.
399. Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, et al. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. Proc Natl Acad Sci U S A 1986; 83: 2841-2845.
400. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. Proc Natl Acad Sci U S A 1986; 83: 5111-5115.
401. Rodrigues NR, Dunham I, Yu CY, et al. Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. Embo J 1987; 6: 1653-1661.
402. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Endocr Rev 2000; 21: 245-291.
403. Krone N, Braun A, Roscher AA, et al. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 1059-1065.
404. New MI, Abraham M, Gonzalez B, et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110: 2611-2616.
405. Partanen J, Koskimies S, Sipila I, et al. Major-histocompatibility-complex gene markers and restriction-fragment analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) and complement C4 genes in classical congenital adrenal hyperplasia patients in a single population. Am J Hum Genet 1989; 44: 660-670.
406. Fleischnick E, Awdeh ZL, Raum D, et al. Extended MHC haplotypes in 21-hydroxylase-deficiency congenital adrenal hyperplasia: shared genotypes in unrelated patients. Lancet 1983; 1: 152-156.
407. Holler W, Scholz S, Knorr D, et al. Genetic differences between the salt-wasting, simple virilizing, and nonclassical types of congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 1985; 60: 757-763.

408. Pollack MS, Levine LS, O'Neill GJ, et al. HLA linkage and B14, DR1, BfS haplotype association with the genes for late onset and cryptic 21-hydroxylase deficiency. Am J Hum Genet 1981; 33: 540-550.

409. Speiser PW, New MI, White PC. Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14,DR1. N Engl J Med 1988; 319: 19-23.

410. Morel Y, Andre J, Uring-Lambert B, et al. Rearrangements and point mutations of P450c21 genes are distinguished by five restriction endonuclease haplotypes identified by a new probing strategy in 57 families with congenital adrenal hyperplasia. J Clin Invest 1989; 83: 527-536.

411. Rosenbloom AL, Smith DW. Varying expression for salt losing in related patients with congenital adrenal hyperplasia. Pediatrics 1966; 38: 215-219.

412. Stoner E, Dimartino-Nardi J, Kuhnle U, et al. Is salt-wasting in congenital adrenal hyperplasia due to the same gene as the fasciculata defect? Clin Endocrinol 1986; 24: 9-20.

413. Morel Y, David M, Forest MG, et al. Gene conversions and rearrangements cause discordance between inheritance of forms of 21-hydroxylase deficiency and HLA types. J Clin Endocrinol Metab 1989; 68: 592-599.

414. Sinnott PJ, Dyer PA, Price DA, et al. 21-hydroxylase deficiency families with HLA identical affected and unaffected sibs. J Med Genet 1989; 26: 10-17.

415. Gomez-Escobar N, Chou CF, Lin WW, et al. The G11 gene located in the major histocompatibility complex encodes a novel nuclear serine/threonine protein kinase. J Biol Chem 1998; 273: 30954-30960.

416. Law SK, Dodds AW, Porter RR. A comparison of the properties of two classes, C4A and C4B, of the human complement component C4. Embo J 1984; 3: 1819-1823.

417. Yu CY, Belt KT, Giles CM, et al. Structural basis of the polymorphism of human complement components C4A and C4B: gene size, reactivity and antigenicity. Embo J 1986; 5: 2873-2881.

418. Tee MK, Thomson AA, Bristow J, et al. Sequences promoting the transcription of the human XA gene overlapping P450c21A correctly predict the presence of a novel, adrenal-specific, truncated form of tenascin-X. Genomics 1995; 28: 171-178.

419. Wijesuriya SD, Zhang G, Dardis A, et al. Transcriptional regulatory elements of the human gene for cytochrome P450c21 (steroid 21-hydroxylase) lie within intron 35 of the linked C4B gene. J Biol Chem 1999; 274: 38097-38106.

420. Morel Y, Bristow J, Gitelman SE, et al. Transcript encoded on the opposite strand of the human steroid 21-hydroxylase/complement component C4 gene locus. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86: 6582-6586.

421. Gitelman SE, Bristow J, Miller WL. Mechanism and consequences of the duplication of the human C4/P450c21/gene X locus. Mol Cell Biol 1992; 12: 2124-2134.

422. Parajes S, Quinteiro C, Dominguez F, et al. High frequency of copy number variations and sequence variants at CYP21A2 locus: implication for the genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. PLoS One 2008; 3: e2138.

423. Bristow J, Tee MK, Gitelman SE, et al. Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. J Cell Biol 1993; 122: 265-278.

424. Burch GH, Bedolli MA, McDonough S, et al. Embryonic expression of tenascin-X suggests a role in limb, muscle, and heart development. Dev Dyn 1995; 203: 491-504.

425. Speek M, Barry F, Miller WL. Alternate promoters and alternate splicing of human tenascin-X, a gene with 5' and 3' ends buried in other genes. Hum Mol Genet 1996; 5: 1749-1758.

426. Burch GH, Gong Y, Liu W, et al. Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome. Nat Genet 1997; 17: 104-108.

427. Elefteriou F, Exposito JY, Garrone R, et al. Characterization of the bovine tenascin-X. J Biol Chem 1997; 272: 22866-22874.

428. Lethias C, Carisey A, Comte J, et al. A model of tenascin-X integration within the collagenous network. FEBS letters 2006; 580: 6281-6285.

429. Schalkwijk J, Zweers MC, Steijlen PM, et al. A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. N Engl J Med 2001; 345: 1167-1175.

430. Miller WL, Morel Y. The molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. Annu Rev Genet 1989; 23: 371-393.

431. Morel Y, Miller WL. Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Adv Hum Genet 1991; 20: 1-68.
432. White PC, Tusie-Luna MT, New MI, et al. Mutations in steroid 21-hydroxylase (CYP21). Hum Mutat 1994; 3: 373-378.
433. Matteson KJ, Phillips JA, 3rd, Miller WL, et al. P450XXI (steroid 21-hydroxylase) gene deletions are not found in family studies of congenital adrenal hyperplasia. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84: 5858-5862.
434. Baltimore D. Gene conversion: some implications for immunoglobulin genes. Cell 1981; 24: 592-594.
435. Wurtman RJ, Pohorecky LA. Adrenocortical control of epinephrine synthesis in health and disease. Adv Metab Disord 1971; 5: 53-76.
436. Merke DP, Chrousos GP, Eisenhofer G, et al. Adrenomedullary dysplasia and hypofunction in patients with classic 21-hydroxylase deficiency. N Engl J Med 2000; 343: 1362-1368.
437. Goto M, Piper Hanley K, Marcos J, et al. In humans, early cortisol biosynthesis provides a mechanism to safeguard female sexual development. J Clin Invest 2006; 116: 953-960.
438. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Invest 1992; 90: 584-595.
439. Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, et al. Consensus statement on management of intersex disorders. Arch Dis Child 2006; 91: 554-563.
440. Clayton PE, Miller WL, Oberfield SE, et al. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the European Society for Paediatric Endocrinology and the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. Horm Res 2002; 58: 188-195.
441. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95: 4133-4160.
442. Nimkarn S, New MI. Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2007; 3: 405-413.

443. Azziz R, Sanchez LA, Knochenhauer ES, et al. Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 453-462.

444. Azziz R, Dewailly D, Owerbach D. Clinical review 56: Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. J Clin Endocrinol Metab 1994; 78: 810-815.

445. Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. Endocrinol Metab Clin North Am 2001; 30: 31-59, vi.

446. Speiser PW, Knochenhauer ES, Dewailly D, et al. A multicenter study of women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia: relationship between genotype and phenotype. Mol Genet Metab 2000; 71: 527-534.

447. Kahsar-Miller MD, Nixon C, Boots LR, et al. Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS. Fertil Steril 2001; 75: 53-58.

448. Legro RS, Driscoll D, Strauss JF, 3rd, et al. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 14956-14960.

449. Urbanek M, Legro RS, Driscoll DA, et al. Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 8573-8578.

450. Yildiz BO, Yarali H, Oguz H, et al. Glucose intolerance, insulin resistance, and hyperandrogenemia in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88: 2031-2036.

451. Ewens KG, Stewart DR, Ankener W, et al. Family-based analysis of candidate genes for polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95: 2306-2315.

452. Armengaud JB, Charkaluk ML, Trivin C, et al. Precocious pubarche: distinguishing late-onset congenital adrenal hyperplasia from premature adrenarche. J Clin Endocrinol Metab 2009; 94: 2835-2840.

453. Nandagopal R, Sinaii N, Avila NA, et al. Phenotypic profiling of parents with cryptic nonclassic congenital adrenal hyperplasia: findings in 145 unrelated families. European J Endocrinol 2011; 164: 977-984.

454. Carmina E, Rosato F, Janni A, et al. Extensive clinical experience: relative prevalence of different androgen excess disorders in 950 women referred because of clinical hyperandrogenism. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 2-6.

455. Witchel SF, Azziz R. Congenital adrenal hyperplasia. J Pediatr Adolesc Gynecol 2011; 24: 116-126.

456. Robyr D, Llor J, Gaudin G, et al. [Polycystic ovary syndrome and congenital adrenal hyperplasia: a different entity for comparable phenotypes?]. Rev Med Suisse 2007; 3: 1595-1596, 1598, 1600-1591.

457. Pall M, Azziz R, Beires J, et al. The phenotype of hirsute women: a comparison of polycystic ovary syndrome and 21-hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia. Fertil Steril 2010; 94: 684-689.

458. Moran C, Azziz R. 21-hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia: the great pretender. Semin Reprod Med 2003; 21: 295-300.

459. Kumar A, Woods KS, Bartolucci AA, et al. Prevalence of adrenal androgen excess in patients with the polycystic ovary syndrome (PCOS). Clin Endocrinol 2005; 62: 644-649.

460. Moran C, Reyna R, Boots LS, et al. Adrenocortical hyperresponsiveness to corticotropin in polycystic ovary syndrome patients with adrenal androgen excess. Fertil Steril 2004; 81: 126-131.

461. Moran C, Azziz R, Carmina E, et al. 21-Hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia is a progressive disorder: a multicenter study. Am J Obstet Gynecol 2000; 183: 1468-1474.

462. Pignatelli D. Non-classic adrenal hyperplasia due to the deficiency of 21-hydroxylase and its relation to polycystic ovarian syndrome. Front Horm Res 2013; 40: 158-170.

463. White PC, Curnow KM, Pascoe L. Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes. Endocr Rev 1994; 15: 421-438.

464. Fardella CE,Miller WL. Molecular biology of mineralocorticoid metabolism. Annu Rev Nutr 1996; 16: 443-470.

465. Mornet E, Dupont J, Vitek A, et al. Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). J Biol Chem 1989; 264: 20961-20967.

466. Chua SC, Szabo P, Vitek A, et al. Cloning of cDNA encoding steroid 11 beta-hydroxylase (P450c11). Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84: 7193-7197.
467. Nishimoto K, Nakagawa K, Li D, et al. Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95: 2296-2305.
468. Ogishima T, Shibata H, Shimada H, et al. Aldosterone synthase cytochrome P-450 expressed in the adrenals of patients with primary aldosteronism. J Biol Chem 1991; 266: 10731-10734.
469. Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, et al. The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. Mol Endocrinol 1991; 5: 1513-1522.
470. Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Toda K, et al. Role of steroid 11 beta-hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 1458-1462.
471. Auchus RJ, Chandler DW, Singeetham S, et al. Measurement of 18-hydroxycorticosterone during adrenal vein sampling for primary aldosteronism. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92: 2648-2651.
472. Clyne CD, Zhang Y, Slutsker L, et al. Angiotensin II and potassium regulate human CYP11B2 transcription through common cis-elements. Mol Endocrinol 1997; 11: 638-649.
473. Bassett MH, White PC, Rainey WE. The regulation of aldosterone synthase expression. Mol Cell Endocrinol 2004; 217: 67-74.
474. Chabraoui L, Abid F, Menassa R, et al. Three novel CYP11B1 mutations in congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11Beta-hydroxylase deficiency in a moroccan population. Horm Res Paediat 2010; 74: 182-189.
475. Nimkarn S, New MI. Steroid 11beta- hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. Trends in endocrinology and metabolism: TEM 2008; 19: 96-99.
476. Stenson PD, Ball E, Howells K, et al. Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive central mutation database. J Med Genet 2008; 45: 124-126.
477. Kulle AE, Riepe FG, Melchior D, et al. A novel ultrapressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of androstenedione, testosterone, and dihydrotestosterone in

pediatric blood samples: age- and sex-specific reference data. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95: 2399-2409.

478. Krone N, Grischuk Y, Muller M, et al. Analyzing the functional and structural consequences of two point mutations (P94L and A368D) in the CYP11B1 gene causing congenital adrenal hyperplasia resulting from 11-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 2682-2688.
479. White PC, Dupont J, New MI, et al. A mutation in CYP11B1 (Arg-448----His) associated with steroid 11 beta-hydroxylase deficiency in Jews of Moroccan origin. J Clin Invest 1991; 87: 1664-1667.
480. Zachmann M, Tassinari D, Prader A. Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency. A study of 25 patients. J Clin Endocrinol Metab 1983; 56: 222-229.
481. Pasterski V, Hindmarsh P, Geffner M, et al. Increased aggression and activity level in 3- to 11-year-old girls with congenital adrenal hyperplasia (CAH). Horm Behav 2007; 52: 368-374.
482. Joehrer K, Geley S, Strasser-Wozak EM, et al. CYP11B1 mutations causing non-classic adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency. Hum Mol Genet 1997; 6: 1829-1834.
483. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. N Engl J Med 2003; 349: 776-788.
484. Wu C, Zhou Q, Wan L, et al. Novel homozygous p.R454C mutation in the CYP11B1 gene leads to 11beta-hydroxylase deficiency in a Chinese patient. Fertil Steril 2011; 95: 1122 e1123-1126.
485. Krone N, Grotzinger J, Holterhus PM, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to 11-hydroxylase deficiency--insights from two novel CYP11B1 mutations (p.M92X, p.R453Q). Horm Res 2009; 72: 281-286.
486. Chemaitilly W, Wilson RC, New MI. Hypertension and adrenal disorders. Curr Hypertens Rep 2003; 5: 498-504.
487. Deng C, Ji J, Zhang L, et al. Diagnosis of congenital adrenal hyperplasia by rapid determination of 17alpha-hydroxyprogesterone in dried blood spots by gas chromatography/mass spectrometry following microwave-assisted silylation. Rapid Commun Mass Spectrom 2005; 19: 2974-2978.

488. Peters CJ, Nugent T, Perry LA, et al. Cosegregation of a novel homozygous CYP11B1 mutation with the phenotype of non-classical congenital adrenal hyperplasia in a consanguineous family. Horm Res 2007; 67: 189-193.

489. Sonino N, Levine LS, Vecsei P, et al. Parallelism of 11 beta- and 18-hydroxylation demonstrated by urinary free hormones in man. J Clin Endocrinol Metab 1980; 51: 557-560.

490. Holcombe JH, Keenan BS, Nichols BL, et al. Neonatal salt loss in the hypertensive form of congenital adrenal hyperplasia. Pediatrics 1980; 65: 777-781.

491. Peter M, Janzen N, Sander S, et al. A case of 11beta-hydroxylase deficiency detected in a newborn screening program by second-tier LC-MS/MS. Horm Res 2008; 69: 253-256.

492. Morrison N, Nickson DA, McBride MW, et al. Regional chromosomal assignment of human 3-beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase to 1p13.1 by non-isotopic in situ hybridisation. Hum Genet 1991; 87: 223-225.

493. Rheaume E, Simard J, Morel Y, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene. Nat Genet 1992; 1: 239-245.

494. Welzel M, Wustemann N, Simic-Schleicher G, et al. Carboxyl-terminal mutations in 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II cause severe salt-wasting congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93: 1418-1425.

495. Scrutton NS, Berry A, Perham RN. Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. Nature 1990; 343: 38-43.

496. Thomas JL, Nash WE, Myers RP, et al. Affinity radiolabeling identifies peptides and amino acids associated with substrate binding in human placental 3 beta-hydroxy-delta(5)-steroid dehydrogenase. J Biol Chem 1993; 268: 18507-18512.

497. Thomas JL, Evans BW, Blanco G, et al. Site-directed mutagenesis identifies amino acid residues associated with the dehydrogenase and isomerase activities of human type I (placental) 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase. J Steroid Biochem Mol Biol 1998; 66: 327-334.

498. Thomas JL, Evans BW, Blanco G, et al. Creation of a fully active, cytosolic form of human type I 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase by the deletion of a membrane-spanning domain. J Mol Endocrinol 1999; 23: 231-239.

499. Bongiovanni AM. The adrenogenital syndrome with deficiency of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. J Clin Invest 1962; 41: 2086-2092.

500. Subramaniam P, Clayton PT, Portmann BC, et al. Variable clinical spectrum of the most common inborn error of bile acid metabolism--3beta-hydroxy-Delta 5-C27-steroid dehydrogenase deficiency. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2010; 50: 61-66.

501. Cara JF, Moshang T, Jr., Bongiovanni AM, et al. Elevated 17-hydroxyprogesterone and testosterone in a newborn with 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. N Engl J Med 1985; 313: 618-621.

502. Sakkal-Alkaddour H, Zhang L, Yang X, et al. Studies of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase genes in infants and children manifesting premature pubarche and increased adrenocorticotropin-stimulated delta 5-steroid levels. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 3961-3965.

503. Marui S, Castro M, Latronico AC, et al. Mutations in the type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B2) gene can cause premature pubarche in girls. Clin Endocrinol 2000; 52: 67-75.

504. Moran C, Potter HD, Reyna R, et al. Prevalence of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia in hyperandrogenic women with adrenal androgen excess. Am J Obstet Gynecol 1999; 181: 596-600.

505. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 1988; 240: 889-895.

506. Olefsky JM. Nuclear receptor minireview series. J Biol Chem 2001; 276: 36863-36864.

507. Li J,Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action. Maturitas 2009; 63: 142-148.

508. Sahin Y, Kelestimur F. The frequency of late-onset 21-hydroxylase and 11 beta-hydroxylase deficiency in women with polycystic ovary syndrome. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies 1997; 137: 670-674.

509. Bharaj BS, Vassilikos EJ, Diamandis EP. Rapid and accurate determination of (CAG)n repeats in the androgen receptor gene using polymerase chain reaction and automated fragment analysis. Clin Biochem 1999; 32: 327-332.

510. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. Fertil Steril 2009; 91: 456-488.

511. Di Fede G, Mansueto P, Pepe I, et al. High prevalence of polycystic ovary syndrome in women with mild hirsutism and no other significant clinical symptoms. Fertil Steril 2010; 94: 194-197.

512. Karaca Z, Acmaz B, Acmaz G, et al. Routine screening for Cushing's syndrome is not required in patients presenting with hirsutism. Eur J Endocrinol 2013; 168: 379-384.

513. Carmina E. Prevalence of idiopathic hirsutism. Eur J Endocrinol 1998; 139: 421-423.

514. New MI. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 4205-4214.

515. Unluhizarci K, Kula M, Dundar M, et al. The prevalence of non-classic adrenal hyperplasia among Turkish women with hyperandrogenism. Gynecol Endocrinol 2010; 26: 139-143.

516. Fanta M, Cibula D, Vrbikova J. Prevalence of nonclassic adrenal hyperplasia (NCAH) in hyperandrogenic women. Gynecol Endocrinol 2008; 24: 154-157.

517. Azziz R, Rafi A, Smith BR, et al. On the origin of the elevated 17-hydroxyprogesterone levels after adrenal stimulation in hyperandrogenism. J Clin Endocrinol Metab 1990; 70: 431-436.

518. Vermesh M, Silva PD, Rosen GF, et al. Effect of androgen on adrenal steroidogenesis in normal women. J Clin Endocrinol Metab 1988; 66: 128-130.

519. Hart R, Hickey M, Franks S. Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2004; 18: 671-683.

520. Franks S. Polycystic ovary syndrome. N Engl J Med 1995; 333: 853-861.

521. Falsetti L, Gambera A, Andrico S, et al. Acne and hirsutism in polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine-metabolic and ultrasonographic differences. Gynecol Endocrinol 2002; 16: 275-284.

522. Ruutiainen K, Erkkola R, Gronroos MA, et al. Influence of body mass index and age on the grade of hair growth in hirsute women of reproductive ages. Fertil Steril 1988; 50: 260-265.

523. Carmina E, Koyama T, Chang L, et al. Does ethnicity influence the prevalence of adrenal hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome? Am J Obstet Gynecol 1992; 167: 1807-1812.

524. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, et al. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 3078-3082.

525. Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, et al. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 2434-2438.

526. Tehrani FR, Simbar M, Tohidi M, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample of Iranian population: Iranian PCOS prevalence study. Reprod Biol Endocrinol 2011; 9: 39.

527. Musmar S, Afaneh A, Mo'alla H. Epidemiology of polycystic ovary syndrome: a cross sectional study of university students at An-Najah national university-Palestine. Reprod Biol Endocrinol 2013; 11: 47.

528. Yildiz BO, Bozdag G, Yapici Z, et al. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. Hum Reprod 2012; 27: 3067-3073.

529. March WA, Moore VM, Willson KJ, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. Hum Reprod 2010; 25: 544-551.

530. DeUgarte CM, Woods KS, Bartolucci AA, et al. Degree of facial and body terminal hair growth in unselected black and white women: toward a populational definition of hirsutism. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 1345-1350.

531. Unluhizarci K, Gokce C, Atmaca H, et al. A detailed investigation of hirsutism in a Turkish population: idiopathic hyperandrogenemia as a perplexing issue. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2004; 112: 504-509.

532. Escobar-Morreale HF, Serrano-Gotarredona J, Garcia-Robles R, et al. Mild adrenal and ovarian steroidogenic abnormalities in hirsute women without hyperandrogenemia: does idiopathic hirsutism exist? Metabolism 1997; 46: 902-907.

533. Atmaca H, Tanriverdi F, Unluhizarci K, et al. Investigation of adrenal functions in patients with idiopathic hyperandrogenemia. Eur J Endocrinol 2006; 155: 307-311.

534. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod 2004; 19: 41-47.

535. Tehrani FR, Rashidi H, Azizi F. The prevalence of idiopathic hirsutism and polycystic ovary syndrome in the Tehran Lipid and Glucose Study. Reprod Biol Endocrinol 2011; 9: 144.

536. De Leo V, Di Sabatino A, Musacchio MC, et al. Effect of oral contraceptives on markers of hyperandrogenism and SHBG in women with polycystic ovary syndrome. Contraception 2010; 82: 276-280.

537. WEB_1(2015). The Human Gene Mutation Database (HGMD)'s web site. www.hgmd.cf.ac.uk, (01.11.2015).

538. Alper OM, Erengin H, Manguoglu AE, et al. Consanguineous marriages in the province of Antalya, Turkey. Ann Genet 2004; 47: 129-138.

539. Haider S, Islam B, D'Atri V, et al. Structure-phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110: 2605-2610.

540. Capoluongo E, Concolino P, Vendittelli F, et al. Gene symbol: CYP21A2. Disease: Non-classic 21-Hydroxylase deficiency. Hum Genet 2008; 123: 553.

541. Robins T, Carlsson J, Sunnerhagen M, et al. Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. Mol Endocrinol 2006; 20: 2946-2964.

542. Ezquieta B, Cueva E, Varela J, et al. Non-classical 21-hydroxylase deficiency in children: association of adrenocorticotropic hormone-stimulated 17-hydroxyprogesterone with the risk of compound heterozygosity with severe mutations. Acta Paediatr Suppl 2002; 91: 892-898.

543. Nikoshkov A, Lajic S, Holst M, et al. Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 194-199.

544. Zhao B, Lei L, Kagawa N, et al. Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. J Biol Chem 2012; 287: 10613-10622.

545. Helmberg A, Tusie-Luna MT, Tabarelli M, et al. R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. Mol Endocrinol 1992; 6: 1318-1322.

546. Globerman H, Amor M, Parker KL, et al. Nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency. J Clin Invest 1988; 82: 139-144.

547. Kleinle S, Lang R, Fischer GF, et al. Duplications of the functional CYP21A2 gene are primarily restricted to Q318X alleles: evidence for a founder effect. J Clin Endocrinol Metab 2009; 94: 3954-3958.

548. Kharrat M, Riahi A, Maazoul F, et al. Detection of a frequent duplicated CYP21A2 gene carrying a Q318X mutation in a general population with quantitative PCR methods. Diagn Mol Pathol 2011; 20: 123-127.

549. Kharrat M, Tardy V, M'Rad R, et al. Molecular genetic analysis of Tunisian patients with a classic form of 21-hydroxylase deficiency: identification of four novel mutations and high prevalence of Q318X mutation. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 368-374.

550. Barbat B, Bogyo A, Raux-Demay MC, et al. Screening of CYP21 gene mutations in 129 French patients affected by steroid 21-hydroxylase deficiency. Hum Mutat 1995; 5: 126-130.

551. Chen JM, Cooper DN, Chuzhanova N, et al. Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease. Nat Rev Genet 2007; 8: 762-775.

552. L'Allemand D, Tardy V, Gruters A, et al. How a patient homozygous for a 30-kb deletion of the C4-CYP 21 genomic region can have a nonclassic form of 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 4562-4567.

553. Ebersberger I, Metzler D, Schwarz C, et al. Genomewide comparison of DNA sequences between humans and chimpanzees. Am J Hum Genet 2002; 70: 1490-1497.

554. Plotkin JB, Robins H, Levine AJ. Tissue-specific codon usage and the expression of human genes. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 12588-12591.
555. Lampson BL, Pershing NL, Prinz JA, et al. Rare codons regulate KRas oncogenesis. Curr Biol 2013; 23: 70-75.
556. Asanuma A, Ohura T, Ogawa E, et al. Molecular analysis of Japanese patients with steroid 21-hydroxylase deficiency. J Hum Genet 1999; 44: 312-317.
557. Bronstad I, Breivik L, Methlie P, et al. Functional studies of novel CYP21A2 mutations detected in Norwegian patients with congenital adrenal hyperplasia. Endocr Connect 2014; 3: 67-74.
558. Chin KK, Chang SF. The -104G nucleotide of the human CYP21 gene is important for CYP21 transcription activity and protein interaction. Nucleic Acids Res 1998; 26: 1959-1964.
559. Kagawa N, Waterman MR. Evidence that an adrenal-specific nuclear protein regulates the cAMP responsiveness of the human CYP21B (P450C21) gene. J Biol Chem 1991; 266: 11199-11204.
560. Araujo RS, Mendonca BB, Barbosa AS, et al. Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92: 4028-4034.
561. Usui T, Nishisho K, Kaji M, et al. Three novel mutations in Japanese patients with 21-hydroxylase deficiency. Horm Res 2004; 61: 126-132.
562. Tardy VT, Morel Y. Gene symbol: CYP21A2. Hum Genet 2007; 121: 294.
563. Dolzan V, Stopar-Obreza M, Zerjav-Tansek M, et al. Mutational spectrum of congenital adrenal hyperplasia in Slovenian patients: a novel Ala15Thr mutation and Pro30Leu within a larger gene conversion associated with a severe form of the disease. Eur J Endocrinol 2003; 149: 137-144.
564. Bidet M, Bellanne-Chantelot C, Galand-Portier MB, et al. Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and 330 family members. J Clin Endocrinol Metab 2009; 94: 1570-1578.
565. Lajic S, Wedell A. An intron 1 splice mutation and a nonsense mutation (W23X) in CYP21 causing severe congenital adrenal hyperplasia. Hum Genet 1996; 98: 182-184.

566. Di Pasquale L, Indovina S, Wasniewska M, et al. Novel nonsense mutation (W22X) in CYP21A2 gene causing salt-wasting congenital adrenal hyperplasia in a compound heterozygous girl. J Endocrinol Invest 2007; 30: 806-807.

567. Lajic S, Nikoshkov A, Holst M, et al. Effects of missense mutations and deletions on membrane anchoring and enzyme function of human steroid 21-hydroxylase (P450c21). Biochem Biophys Res Comm 1999; 257: 384-390.

568. Tusie-Luna MT, Speiser PW, Dumic M, et al. A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. Mol Endocrinol 1991; 5: 685-692.

569. Barbaro M, Soardi FC, Ostberg LJ, et al. In vitro functional studies of rare CYP21A2 mutations and establishment of an activity gradient for nonclassic mutations improve phenotype predictions in congenital adrenal hyperplasia. Clin Endocrinol 2015; 82: 37-44.

570. Tardy V. Gene symbol: CYP21A2. Disease: steroid 21-hydroxylase deficiency. Hum Genet 2006; 119: 363.

571. Concolino P, Minucci A, Mello E, et al. A new CYP21A2 nonsense mutation causing severe 21-hydroxylase deficiency. Clin Chem Lab Med 2009; 47: 824-825.

572. Soardi FC, Barbaro M, Lau IF, et al. Inhibition of CYP21A2 enzyme activity caused by novel missense mutations identified in Brazilian and Scandinavian patients. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93: 2416-2420.

573. Ohlsson G, Muller J, Skakkebaek NE, et al. Steroid 21-hydroxylase deficiency: mutational spectrum in Denmark, three novel mutations, and in vitro expression analysis. Hum Mutat 1999; 13: 482-486.

574. Nunez BS, Lobato MN, White PC, et al. Functional analysis of four CYP21 mutations from spanish patients with congenital adrenal hyperplasia. Biochem Biophys Res Comm 1999; 262: 635-637.

575. Krone N, Riepe FG, Grotzinger J, et al. Functional characterization of two novel point mutations in the CYP21 gene causing simple virilizing forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 445-454.

576. Lobato MN, Ordonez-Sanchez ML, Tusie-Luna MT, et al. Mutation analysis in patients with congenital adrenal hyperplasia in the Spanish population:

identification of putative novel steroid 21-hydroxylase deficiency alleles associated with the classic form of the disease. Hum Hered 1999; 49: 169-175.

577. Krone N, Roscher AA, Schwarz HP, et al. Comprehensive analytical strategy for mutation screening in 21-hydroxylase deficiency. Clin Chem 1998; 44: 2075-2082.

578. Capoluongo E, Concolino P, Minucci A, et al. Gene symbol: CYP21A2. Disease: Adrenal hyperplasia. Hum Genet 2008; 123: 550.

579. Riepe FG, Hiort O, Grotzinger J, et al. Functional and structural consequences of a novel point mutation in the CYP21A2 gene causing congenital adrenal hyperplasia: potential relevance of helix C for P450 oxidoreductase-21-hydroxylase interaction. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93: 2891-2895.

580. Massimi A, Malaponti M, Federici L, et al. Functional and structural analysis of four novel mutations of CYP21A2 gene in Italian patients with 21-hydroxylase deficiency. Horm Metab Res 2014; 46: 515-520.

581. Minutolo C, Nadra AD, Fernandez C, et al. Structure-based analysis of five novel disease-causing mutations in 21-hydroxylase-deficient patients. PLoS One 2011; 6: e15899.

582. Taboas M, Gomez Acuna L, Scaia MF, et al. Functional studies of p.R132C, p.R149C, p.M283V, p.E431K, and a novel c.652-2A>G mutations of the CYP21A2 gene. PLoS One 2014; 9: e92181.

583. Robins T, Bellanne-Chantelot C, Barbaro M, et al. Characterization of novel missense mutations in CYP21 causing congenital adrenal hyperplasia. Journal of molecular medicine 2007; 85: 247-255.

584. Tardy V, Menassa R, Sulmont V, et al. Phenotype-genotype correlations of 13 rare CYP21A2 mutations detected in 46 patients affected with 21-hydroxylase deficiency and in one carrier. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95: 1288-1300.

585. Vrzalova Z, Hruba Z, St'ahlova Hrabincova E, et al. Identification of CYP21A2 mutant alleles in Czech patients with 21-hydroxylase deficiency. Int J Mol Med 2010; 26: 595-603.

586. Grischuk Y, Rubtsov P, Riepe FG, et al. Four novel missense mutations in the CYP21A2 gene detected in Russian patients suffering from the classical form of congenital adrenal hyperplasia: identification, functional characterization, and structural analysis. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 4976-4980.

587. Balsamo A, Cacciari E, Baldazzi L, et al. CYP21 analysis and phenotype/genotype relationship in the screened population of the Italian Emilia-Romagna region. Clin Endocrinol 2000; 53: 117-125.

588. Concolino P, Vendittelli F, Mello E, et al. Functional analysis of two rare CYP21A2 mutations detected in Italian patients with a mildest form of congenital adrenal hyperplasia. Clin Endocrinol 2009; 71: 470-476.

589. Concolino P, Vendittelli F, Mello E, et al. Two novel CYP21A2 missense mutations in Italian patients with 21-hydroxylase deficiency: Identification and functional characterisation. IUBMB Life 2009; 61: 229-235.

590. Ezquieta B, Cueva E, Oyarzabal M, et al. Gene conversion (655G splicing mutation) and the founder effect (Gln318Stop) contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in the Spanish population. Clin Genet 2002; 62: 181-188.

591. Robins T, Barbaro M, Lajic S, et al. Not all amino acid substitutions of the common cluster E6 mutation in CYP21 cause congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 2148-2153.

592. Loke KY, Lee YS, Lee WW, et al. Molecular analysis of CYP-21 mutations for congenital adrenal hyperplasia in Singapore. Horm Res 2001; 55: 179-184.

593. Bleicken C, Loidi L, Dhir V, et al. Functional characterization of three CYP21A2 sequence variants (p.A265V, p.W302S, p.D322G) employing a yeast co-expression system. Hum Mutat 2009; 30: E443-450.

594. Nikoshkov A, Lajic S, Vlamis-Gardikas A, et al. Naturally occurring mutants of human steroid 21-hydroxylase (P450c21) pinpoint residues important for enzyme activity and stability. J Biol Chem 1998; 273: 6163-6165.

595. Wedell A, Ritzen EM, Haglund-Stengler B, et al. Steroid 21-hydroxylase deficiency: three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 7232-7236.

596. Stikkelbroeck NM, Hoefsloot LH, de Wijs IJ, et al. CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88: 3852-3859.

597. Loidi L, Quinteiro C, Parajes S, et al. High variability in CYP21A2 mutated alleles in Spanish 21-hydroxylase deficiency patients, six novel mutations and a founder effect. Clin Endocrinol 2006; 64: 330-336.

598. Levo A,Partanen J. Novel nonsense mutation (W302X) in the steroid 21-hydroxylase gene of a Finnish patient with the salt-wasting form of congenital adrenal hyperplasia. Hum Mutat 1997; 9: 363-365.

599. Lajic S, Clauin S, Robins T, et al. Novel mutations in CYP21 detected in individuals with hyperandrogenism. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 2824-2829.

600. Dolzan V, Solyom J, Fekete G, et al. Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. Eur J Endocrinol 2005; 153: 99-106.

601. Lee HH, Chao HT, Lee YJ, et al. Identification of four novel mutations in the CYP21 gene in congenital adrenal hyperplasia in the Chinese. Hum Genet 1998; 103: 304-310.

602. Deneux C, Tardy V, Dib A, et al. Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 207-213.

603. Bojunga J, Welsch C, Antes I, et al. Structural and functional analysis of a novel mutation of CYP21B in a heterozygote carrier of 21-hydroxylase deficiency. Hum Genet 2005; 117: 558-564.

604. Bernal Gonzalez C, Fernandez Salas C, Martinez S, et al. [Premature androgenetic alopecia in adult male with nonclassic 21-OH deficiency. A novel nonsense CYP21A2 mutation (Y336X) in 2 affected siblings]. Med Clin 2006; 127: 617-621.

605. Balsamo A, Cicognani A, Baldazzi L, et al. CYP21 genotype, adult height, and pubertal development in 55 patients treated for 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88: 5680-5688.

606. Lajic S, Levo A, Nikoshkov A, et al. A cluster of missense mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. Hum Genet 1997; 99: 704-709.

607. Krone N, Riepe FG, Grotzinger J, et al. The residue E351 is essential for the activity of human 21-hydroxylase: evidence from a naturally occurring novel point mutation compared with artificial mutants generated by single amino acid substitutions. J Mol Med 2005; 83: 561-568.

608. Abid F, Tardy V, Gaouzi A, et al. CYP21A2 gene mutation analysis in Moroccan patients with classic form of 21-hydroxylase deficiency: high regional prevalence of p.Q318X mutation and identification of a novel p.L353R mutation. Clin Chem Lab Med 2008; 46: 1707-1713.

609. Chiou SH, Hu MC, Chung BC. A missense mutation at Ile172----Asn or Arg356----Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. J Biol Chem 1990; 265: 3549-3552.

610. Levo A, Partanen J. Novel mutations in the human CYP21 gene. Prenat Diagn 2001; 21: 885-889.

611. Zeng X, Witchel SF, Dobrowolski SF, et al. Detection and assignment of CYP21 mutations using peptide mass signature genotyping. Mol Genet Metab 2004; 82: 38-47.

612. Kirby-Keyser L, Porter CC, Donohoue PA. E380D: a novel point mutation of CYP21 in an HLA-homozygous patient with salt-losing congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Hum Mutat 1997; 9: 181-182.

613. Wasniewska M, Mirabelli S, Baldazzi L, et al. Novel mutation of CYP21A2 gene (N387K) affecting a non-conserved amino acid residue in exon 9. J Endocrinol Invest 2009; 32: 633.

614. Baradaran-Heravi A, Vakili R, Robins T, et al. Three novel CYP21A2 mutations and their protein modelling in patients with classical 21-hydroxylase deficiency from northeastern Iran. Clin Endocrinol 2007; 67: 335-341.

615. Wedell A,Luthman H. Steroid 21-hydroxylase (P450c21): a new allele and spread of mutations through the pseudogene. Hum Genet 1993; 91: 236-240.

616. Finkielstain GP, Chen W, Mehta SP, et al. Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2011; 96: E161-172.

617. Yu Y, Wang J, Huang X, et al. Molecular characterization of 25 Chinese pedigrees with 21-hydroxylase deficiency. Genet Test Mol Biomarkers 2011; 15: 137-142.

618. Billerbeck AE, Mendonca BB, Pinto EM, et al. Three novel mutations in CYP21 gene in Brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 4314-4317.

619. Billerbeck AE, Bachega TA, Frazatto ET, et al. A novel missense mutation, GLY424SER, in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 2870-2872.

620. Dain L, Minutolo C, Buzzalino N, et al. Gene symbol: CYP21A2. Disease: adrenal hyperplasia, CYP21. Hum Genet 2006; 119: 363.

621. Carvalho B, Marques CJ, Carvalho D, et al. Novel human pathological mutations. Gene symbol: CYP21A2. Disease: adrenal hyperplasia. Hum Genet 2010; 127: 482-483.

622. Barbaro M, Baldazzi L, Balsamo A, et al. Functional studies of two novel and two rare mutations in the 21-hydroxylase gene. J M Med 2006; 84: 521-528.

623. Wang H, Jiang L, Wang PP, et al. Mutation analysis in families with 21-hydroxylase deficiency. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 2007; 24: 681-684.

624. Di Pasquale G, Wasniewska M, Caruso M, et al. Salt wasting phenotype in a compound heterozygous girl with P482S mutation associated with anovel mutation of CYP21 gene (Q481P). J Endocrinol Invest 2005; 28: 1038-1039.

625. Barbaro M, Lajic S, Baldazzi L, et al. Functional analysis of two recurrent amino acid substitutions in the CYP21 gene from Italian patients with congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 2402-2407.

626. Friaes A, Rego AT, Aragues JM, et al. CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. Mol Genet Metab 2006; 88: 58-65.

627. Ordonez-Sanchez ML, Ramirez-Jimenez S, Lopez-Gutierrez AU, et al. Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations. Hum Genet 1998; 102: 170-177.

628. Katsumata N, Shinagawa T, Horikawa R, et al. Novel intronic CYP21A2 mutation in a Japanese patient with classic salt-wasting steroid 21-hydroxylase deficiency. Metabolism 2010; 59: 1628-1632.

629. Kharrat M, Tardy V, M'Rad R, et al. A novel 13-bp deletion in exon 1 of CYP21 gene causing severe congenital adrenal hyperplasia. Diagn Mol Pathol 2005; 14: 250-252.

630. Krone N, Braun A, Roscher AA, et al. A novel frameshift mutation (141delT) in exon 1 of the 21-hydroxylase gene (CYP21) in a patient with the salt wasting form of congenital adrenal hyperplasia. Mutation in brief no. 255. Online. Hum Mutat 1999; 14: 90-91.

631. Higashi Y, Tanae A, Inoue H, et al. Evidence for frequent gene conversion in the steroid 21-hydroxylase P-450(C21) gene: implications for steroid 21-hydroxylase deficiency. Am J Hum Genet 1988; 42: 17-25.

632. Koyama S, Toyoura T, Saisho S, et al. Genetic analysis of Japanese patients with 21-hydroxylase deficiency: identification of a patient with a new mutation of a homozygous deletion of adenine at codon 246 and patients without demonstrable mutations within the structural gene for CYP21. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 2668-2673.

633. Ezquieta B, Oyarzabal M, Jariego CM, et al. A novel frameshift mutation in the first exon of the 21-OH gene found in homozygosity in an apparently nonconsanguineous family. Horm Res 1999; 51: 135-141.

634. Lau IF, Soardi FC, Lemos-Marini SH, et al. H28+C insertion in the CYP21 gene: a novel frameshift mutation in a Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 5877-5880.

635. Janner M, Pandey AV, Mullis PE, et al. Clinical and biochemical description of a novel CYP21A2 gene mutation 962_963insA using a new 3D model for the P450c21 protein. Eur J Endocrinol 2006; 155: 143-151.

636. Krone N, Riepe FG, Partsch CJ, et al. Three novel point mutations of the CYP21 gene detected in classical forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Exp Clin Endocrinol Diabetes : 2006; 114: 111-117.

637. Dubey S, Idicula-Thomas S, Anwaruddin M, et al. A novel 9-bp insertion detected in steroid 21-hydroxylase gene (CYP21A2): prediction of its structural

and functional implications by computational methods. J Biomed Sci 2009; 16: 3.

638. Witchel SF, Smith R, Suda-Hartman M. Identification of CYP21 mutations, one novel, by single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis. Mutations in brief no. 218. Online. Hum Mutat 1999; 13: 172.

639. Coeli FB, Soardi FC, Bernardi RD, et al. Novel deletion alleles carrying CYP21A1P/A2 chimeric genes in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. BMC Med Genet 2010; 11: 104.

640. Werkmeister JW, New MI, Dupont B, et al. Frequent deletion and duplication of the steroid 21-hydroxylase genes. Am J Hum Genet 1986; 39: 461-469.

641. Chen W, Kim MS, Shanbhag S, et al. The phenotypic spectrum of contiguous deletion of CYP21A2 and tenascin XB: quadricuspid aortic valve and other midline defects. Am J Med Genet. Part A 2009; 149A: 2803-2808.

642. Wedell A, Chun X, Luthman H. A steroid 21-hydroxylase allele concomitantly carrying four disease-causing mutations is not uncommon in the swedish population. Hum Genet 1994; 93: 204-206.

643. Donohoue PA, van Dop C, McLean RH, et al. Gene conversion in salt-losing congenital adrenal hyperplasia with absent complement C4B protein. J Clin Endocrinol Metab 1986; 62: 995-1002.

644. Wedell A, Thilen A, Ritzen EM, et al. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. J Clin Endocrinol Metab 1994; 78: 1145-1152.

645. Levo A,Partanen J. Mutation-haplotype analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency in Finland. Implications for the population history of defective alleles. Hum Genet 1997; 99: 488-497.

646. Koppens PF, Hoogenboezem T, Degenhart HJ. CYP21 and CYP21P variability in steroid 21-hydroxylase deficiency patients and in the general population in the Netherlands. Eur J Hum Genet 2000; 8: 827-836.

647. Bristow J, Gitelman SE, Tee MK, et al. Abundant adrenal-specific transcription of the human P450c21A "pseudogene". J Biol Chem 1993; 268: 12919-12924.

648. Zhang HJ, Yang J, Zhang MN, et al. Variations in the promoter of CYP21A2 gene identified in a Chinese patient with simple virilizing form of 21-hydroxylase deficiency. Clin Endocrinol 2009; 70: 201-207.

649. Belkina NV, Lisurek M, Ivanov AS, et al. Modelling of three-dimensional structures of cytochromes P450 11B1 and 11B2. J Inorg Biochem 2001; 87: 197-207.

650. Barr M, MacKenzie SM, Wilkinson DM, et al. Functional effects of genetic variants in the 11beta-hydroxylase (CYP11B1) gene. Clin Endocrinol 2006; 65: 816-825.

651. Gotoh O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. J Biol Chem 1992; 267: 83-90.

652. Lisurek M, Bernhardt R. Modulation of aldosterone and cortisol synthesis on the molecular level. Mol Cell Endocrinol 2004; 215: 149-159.

653. Parajes S, Loidi L, Reisch N, et al. Functional consequences of seven novel mutations in the CYP11B1 gene: four mutations associated with nonclassic and three mutations causing classic 11{beta}-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95: 779-788.

654. Merke DP, Tajima T, Chhabra A, et al. Novel CYP11B1 mutations in congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11 beta-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 270-273.

655. Bottner B, Denner K, Bernhardt R. Conferring aldosterone synthesis to human CYP11B1 by replacing key amino acid residues with CYP11B2-specific ones. Eur J Biochem 1998; 252: 458-466.

656. Pascoe L, Curnow KM, Slutsker L, et al. Mutations in the human CYP11B2 (aldosterone synthase) gene causing corticosterone methyloxidase II deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 4996-5000.

657. Zhang G, Rodriguez H, Fardella CE, et al. Mutation T318M in the CYP11B2 gene encoding P450c11AS (aldosterone synthase) causes corticosterone methyl oxidase II deficiency. Am J Hum Genet 1995; 57: 1037-1043.

658. Portrat-Doyen S, Tourniaire J, Richard O, et al. Isolated aldosterone synthase deficiency caused by simultaneous E198D and V386A mutations in the CYP11B2 gene. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 4156-4161.

659. Shojaati K, Causevic M, Kadereit B, et al. Evidence for compromised aldosterone synthase enzyme activity in preeclampsia. Kidney Int 2004; 66: 2322-2328.

660. Grigorescu Sido A, Weber MM, Grigorescu Sido P, et al. 21-Hydroxylase and 11beta-hydroxylase mutations in Romanian patients with classic congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 5769-5773.

661. Naiki Y, Kawamoto T, Mitsuuchi Y, et al. A nonsense mutation (TGG [Trp116]-->TAG [Stop]) in CYP11B1 causes steroid 11 beta-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1993; 77: 1677-1682.

662. Krone N, Riepe FG, Gotze D, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to 11-hydroxylase deficiency: functional characterization of two novel point mutations and a three-base pair deletion in the CYP11B1 gene. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 3724-3730.

663. Geley S, Kapelari K, Johrer K, et al. CYP11B1 mutations causing congenital adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 2896-2901.

664. Zhang M, Liu Y, Sun S, et al. A prevalent and three novel mutations in CYP11B1 gene identified in Chinese patients with 11-beta hydroxylase deficiency. J Steroid Biochem Mol Biol 2013; 133: 25-29.

665. Dumic K, Yuen T, Grubic Z, et al. Two Novel CYP11B1 Gene Mutations in Patients from Two Croatian Families with 11 beta -Hydroxylase Deficiency. Int J Endocrinol 2014; 2014: 185974.

666. Menabo S, Polat S, Baldazzi L, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to 11-beta-hydroxylase deficiency: functional consequences of four CYP11B1 mutations. Eur J Hum Genet 2014; 22: 610-616.

667. Polat S, Kulle A, Karaca Z, et al. Characterisation of three novel CYP11B1 mutations in classic and non-classic 11beta-hydroxylase deficiency. Eur J Endocrinol 2014; 170: 697-706.

668. Wang X, Nie M, Lu L, et al. Identification of seven novel CYP11B1 gene mutations in Chinese patients with 11beta-hydroxylase deficiency. Steroids 2015; 100: 11-16.

669. Curnow KM, Slutsker L, Vitek J, et al. Mutations in the CYP11B1 gene causing congenital adrenal hyperplasia and hypertension cluster in exons 6, 7, and 8. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90: 4552-4556.

670. Kuribayashi I, Nomoto S, Massa G, et al. Steroid 11-beta-hydroxylase deficiency caused by compound heterozygosity for a novel mutation, p.G314R,

in one CYP11B1 allele, and a chimeric CYP11B2/CYP11B1 in the other allele. Horm Res 2005; 63: 284-293.

671. Skinner CA, Rumsby G, Honour JW. Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis for the detection of mutations in the CYP11B1 gene. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 2389-2393.

672. Lee HH, Won GS, Chao HT, et al. Novel missense mutations, GCC [Ala306]- > GTC [Val] and ACG [Thr318]- > CCG [Pro], in the CYP11B1 gene cause steroid 11beta-hydroxylase deficiency in the Chinese. Clin Endocrinol 2005; 62: 418-422.

673. Kharrat M, Trabelsi S, Chaabouni M, et al. Only two mutations detected in 15 Tunisian patients with 11beta-hydroxylase deficiency: the p.Q356X and the novel p.G379V. Clin Genet 2010; 78: 398-401.

674. Nakagawa Y, Yamada M, Ogawa H, et al. Missense mutation in CYP11B1 (CGA[Arg-384]-->GGA[Gly]) causes steroid 11 beta-hydroxylase deficiency. Eur J Endocrinol 1995; 132: 286-289.

675. Motaghedi R, Betensky BP, Slowinska B, et al. Update on the prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 11beta-hydroxylase deficiency. J Pediatr Endocrinol Metab 2005; 18: 133-142.

676. Ye ZQ, Zhang MN, Zhang HJ, et al. A novel missense mutation, GGC(Arg454) --> TGC(Cys), of CYP11B1 gene identified in a Chinese family with steroid 11beta-hydroxylase deficiency. Chin Med J 2010; 123: 1264-1268.

677. Chang SH, Lee HH, Wang PJ, et al. Congenital adrenal hyperplasia with 11 beta-hydroxylase deficiency. J Formosan Med Assoc 2004; 103: 860-864.

678. Hampf M, Dao NT, Hoan NT, et al. Unequal crossing-over between aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase genes causes congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 4445-4452.

679. Soardi FC, Penachioni JY, Justo GZ, et al. Novel mutations in CYP11B1 gene leading to 11 beta-hydroxylase deficiency in Brazilian patients. J Clin Endocrinol Metab 2009; 94: 3481-3485.

680. Andrew M, Barr M, Davies E, et al. Congenital adrenal hyperplasia in a Nigerian child with a novel compound heterozygote mutation in CYP11B1. Clin Endocrinol 2007; 66: 602-603.

681. Chabre O, Portrat-Doyen S, Chaffanjon P, et al. Bilateral laparoscopic adrenalectomy for congenital adrenal hyperplasia with severe hypertension, resulting from two novel mutations in splice donor sites of CYP11B1. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 4060-4068.

682. Bhangoo A, Wilson R, New MI, et al. Donor splice mutation in the 11beta-hydroxylase (CypllB1) gene resulting in sex reversal: a case report and review of the literature. J Pediatr Endocrinol Metab 2006; 19: 1267-1282.

683. Nguyen TP, Nguyen TH, Ngo DN, et al. A novel homozygous mutation IVS6+5G>T in CYP11B1 gene in a Vietnamese patient with 11beta-hydroxylase deficiency. Gene 2015; 565: 291-294.

684. Dumic K, Wilson R, Thanasawat P, et al. Steroid 11-beta hydroxylase deficiency caused by compound heterozygosity for a novel mutation in intron 7 (IVS 7 DS+4A to G) in one CYP11B1 allele and R448H in exon 8 in the other. Eur J Pediatr 2010; 169: 891-894.

685. Chabre O, Portrat-Doyen S, Vivier J, et al. Two novel mutations in splice donor sites of CYP11B1 in congenital adrenal hyperplasia due to 11beta-hydroxylase deficiency. Endocr Res 2000; 26: 797-801.

686. Skinner CA,Rumsby G. Steroid 11 beta-hydroxylase deficiency caused by a five base pair duplication in the CYP11B1 gene. Hum Mol Genet 1994; 3: 377-378.

687. Helmberg A, Ausserer B, Kofler R. Frame shift by insertion of 2 basepairs in codon 394 of CYP11B1 causes congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11 beta-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1992; 75: 1278-1281.

688. Cerame BI, Newfield RS, Pascoe L, et al. Prenatal diagnosis and treatment of 11beta-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia resulting in normal female genitalia. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 3129-3134.

689. Portrat S, Mulatero P, Curnow KM, et al. Deletion hybrid genes, due to unequal crossing over between CYP11B1 (11beta-hydroxylase) and CYP11B2(aldosterone synthase) cause steroid 11beta-hydroxylase deficiency and congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 3197-3201.

690. Pascoe L, Curnow KM, Slutsker L, et al. Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossovers

between CYP11B1 and CYP11B2. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 8327-8331.

691. Lutfallah C, Wang W, Mason JI, et al. Newly proposed hormonal criteria via genotypic proof for type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 2611-2622.

692. Mermejo LM, Elias LL, Marui S, et al. Refining hormonal diagnosis of type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency in patients with premature pubarche and hirsutism based on HSD3B2 genotyping. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 1287-1293.

693. Zhang L, Mason JI, Naiki Y, et al. Characterization of two novel homozygous missense mutations involving codon 6 and 259 of type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3betaHSD) gene causing, respectively, nonsalt-wasting and salt-wasting 3betaHSD deficiency disorder. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 1678-1685.

694. Alos N, Moisan AM, Ward L, et al. A novel A10E homozygous mutation in the HSD3B2 gene causing severe salt-wasting 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency in 46,XX and 46,XY French-Canadians: evaluation of gonadal function after puberty. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 1968-1974.

695. Rheaume E, Sanchez R, Mebarki F, et al. Identification and characterization of the G15D mutation found in a male patient with 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3 beta-HSD) deficiency: alteration of the putative NAD-binding domain of type II 3 beta-HSD. Biochemistry 1995; 34: 2893-2900.

696. Codner E, Okuma C, Iniguez G, et al. Molecular study of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene type II in patients with hypospadias. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 957-964.

697. Mendonca BB, Russell AJ, Vasconcelos-Leite M, et al. Mutation in 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II associated with pseudohermaphroditism in males and premature pubarche or cryptic expression in females. J Mol Endocrinol 1994; 12: 119-122.

698. Rabbani B, Mahdieh N, Haghi Ashtiani MT, et al. In silico structural, functional and pathogenicity evaluation of a novel mutation: an overview of HSD3B2 gene mutations. Gene 2012; 503: 215-221.

699. Mebarki F, Sanchez R, Rheaume E, et al. Nonsalt-losing male pseudohermaphroditism due to the novel homozygous N100S mutation in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80: 2127-2134.

700. Sanchez R, Mebarki F, Rheaume E, et al. Functional characterization of the novel L108W and P186L mutations detected in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene of a male pseudohermaphrodite with congenital adrenal hyperplasia. Hum Mol Genet 1994; 3: 1639-1645.

701. Marui S, Torrealba IM, Russell AJ, et al. A novel homozygous nonsense mutations E135* in the type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in a girl with salt-losing congenital adrenal hyperplasia. Mutations in brief no. 168. Online. Hum Mutat 1998; 12: 139.

702. Simard J, Rheaume E, Sanchez R, et al. Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia due to 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. Mol Endocrinol 1993; 7: 716-728.

703. Nayak S, Lee PA, Witchel SF. Variants of the type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in children with premature pubic hair and hyperandrogenic adolescents. Mol Genet Metab 1998; 64: 184-192.

704. Russell AJ, Wallace AM, Forest MG, et al. Mutation in the human gene for 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II leading to male pseudohermaphroditism without salt loss. J Mol Endocrinol 1994; 12: 225-237.

705. Takasawa K, Ono M, Hijikata A, et al. Two novel HSD3B2 missense mutations with diverse residual enzymatic activities for Delta5-steroids. Clin Endocrinol 2014; 80: 782-789.

706. Katsumata N, Tanae A, Yasunaga T, et al. A novel missense mutation in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in a family with classical salt-wasting congenital adrenal hyperplasia due to 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. Hum Mol Genet 1995; 4: 745-746.

707. Pang S, Wang W, Rich B, et al. A novel nonstop mutation in the stop codon and a novel missense mutation in the type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3beta-HSD) gene causing, respectively, nonclassic and classic 3beta-HSD deficiency congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 2556-2563.

708. Chang YT, Kappy MS, Iwamoto K, et al. Mutations in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in a patient with classic salt-wasting 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency congenital adrenal hyperplasia. Pediatr Res 1993; 34: 698-700.

709. Baquedano MS, Ciaccio M, Marino R, et al. A novel missense mutation in the HSD3B2 gene, underlying nonsalt-wasting congenital adrenal hyperplasia. new insight into the structure-function relationships of 3beta-hydroxysteroid dehidrogenase type II. T J Clin Endocrinol Metab 2015; 100: E191-196.

710. Sanchez R, Rheaume E, Laflamme N, et al. Detection and functional characterization of the novel missense mutation Y254D in type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3 beta HSD) gene of a female patient with nonsalt-losing 3 beta HSD deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1994; 78: 561-567.

711. Tajima T, Fujieda K, Nakae J, et al. Molecular analysis of type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in Japanese patients with classical 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. Hum Mol Genet 1995; 4: 969-971.

712. McCartin S, Russell AJ, Fisher RA, et al. Phenotypic variability and origins of mutations in the gene encoding 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II. J Mol Endocrinol 2000; 24: 75-82.

713. Simard J, Rheaume E, Leblanc JF, et al. Congenital adrenal hyperplasia caused by a novel homozygous frameshift mutation 273 delta AA in type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene (HSD3B2) in three male patients of Afghan/Pakistani origin. Hum Mol Genet 1994; 3: 327-330.

714. Zhang L, Sakkal-Alkaddour H, Chang YT, et al. A new compound heterozygous frameshift mutation in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3 beta-HSD) gene causes salt-wasting 3 beta-HSD deficiency congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 291-295.

715. Xita N, Tsatsoulis A. Review: fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 1660-1666.

716. Beilin J, Ball EM, Favaloro JM, et al. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. J Mol Endocrinol 2000; 25: 85-96.

717. Legro RS, Shahbahrami B, Lobo RA, et al. Size polymorphisms of the androgen receptor among female Hispanics and correlation with androgenic characteristics. Obstet Gynecol 1994; 83: 701-706.

718. Ibanez L, Ong KK, Mongan N, et al. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in the development of ovarian hyperandrogenism. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88: 3333-3338.

719. Dowsing AT, Yong EL, Clark M, et al. Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene. Lancet 1999; 354: 640-643.

720. Mifsud A, Ramirez S, Yong EL. Androgen receptor gene CAG trinucleotide repeats in anovulatory infertility and polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 3484-3488.

721. Hickey T, Chandy A, Norman RJ. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and X-chromosome inactivation in Australian Caucasian women with infertility related to polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 161-165.

722. Shah NA, Antoine HJ, Pall M, et al. Association of androgen receptor CAG repeat polymorphism and polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93: 1939-1945.

723. Tong D, Deng J, Sun H, et al. The relationship between CAG repeat length polymorphism and infertility in Southern Chinese Han women. J Endocrinol Invest 2010; 33: 559-563.

724. Jaaskelainen J, Korhonen S, Voutilainen R, et al. Androgen receptor gene CAG length polymorphism in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2005; 83: 1724-1728.

725. Ferk P, Perme MP, Teran N, et al. Androgen receptor gene (CAG)n polymorphism in patients with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2008; 90: 860-863.

726. Gartler SM, Riggs AD. Mammalian X-chromosome inactivation. Annu Rev Genet 1983; 17: 155-190.

727. Lyon MF. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. Biol Rev Camb Philos Soc 1972; 47: 1-35.

728. Wang Q, Udayakumar TS, Vasaitis TS, et al. Mechanistic relationship between androgen receptor polyglutamine tract truncation and androgen-dependent transcriptional hyperactivity in prostate cancer cells. J Biol Chem 2004; 279: 17319-17328.

729. Callewaert L, Christiaens V, Haelens A, et al. Implications of a polyglutamine tract in the function of the human androgen receptor. Biochem Biophys Res Commun 2003; 306: 46-52.

730. Irvine RA, Ma H, Yu MC, et al. Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. Hum Mol Genet 2000; 9: 267-274.

731. Brockschmidt FF, Nothen MM, Hillmer AM. The two most common alleles of the coding GGN repeat in the androgen receptor gene cause differences in protein function. J Mol Endocrinol 2007; 39: 1-8.

732. Lundin KB, Giwercman A, Dizeyi N, et al. Functional in vitro characterisation of the androgen receptor GGN polymorphism. Mol Cell Endocrinol 2007; 264: 184-187.

733. Rytinki MM, Kaikkonen S, Sutinen P, et al. Analysis of androgen receptor SUMOylation. Methods Mol Biol 2011; 776: 183-197.

734. Pang Y, He CD, Liu Y, et al. Combination of short CAG and GGN repeats in the androgen receptor gene is associated with acne risk in North East China. J Eur Acad Dermatol Venereol 2008; 22: 1445-1451.

735. Kim JJ, Choung SH, Choi YM, et al. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2008; 90: 2318-2323.

736. Liu Q, Hong J, Cui B, et al. Androgen receptor gene CAG(n) trinucleotide repeats polymorphism in Chinese women with polycystic ovary syndrome. Endocrine 2008; 33: 165-170.

737. Dasgupta S, Sirisha PV, Neelaveni K, et al. Androgen receptor CAG repeat polymorphism and epigenetic influence among the south Indian women with Polycystic Ovary Syndrome. PLoS One 2010; 5: e12401.

738. Rajender S, Carlus SJ, Bansal SK, et al. Androgen receptor CAG repeats length polymorphism and the risk of polycystic ovarian syndrome (PCOS). PLoS One 2013; 8: e75709.

739. Schuring AN, Welp A, Gromoll J, et al. Role of the CAG repeat polymorphism of the androgen receptor gene in polycystic ovary syndrome (PCOS). Exp Clin Endocrinol Diabetes 2012; 120: 73-79.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Seher POLAT

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 15 Temmuz 1983, Bünyan

Medeni Durumu: Bekar

Tel: +90 555 394 20 16

email: polatdna@yahoo.com, polats@erciyes.edu.tr

Adres: Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD 38039

Melikgazi/Kayseri

EĞİTİM

Derece	*Kurum*	*Mezuniyet Yılı*
Yüksek Lisans	Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2007
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi	2003
Lise	Akkışla Lisesi	1999

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	*Kurum*	*Görev*
2012- Halen	Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri	Araştırma Görevlisi
2015	Sheffield Universitesi, Biyomedikal Bilim Bölümü, Sheffiedl/İngiltere	Misafir Araştırma Görevlisi
2012	Keil Üniversitesi, Pediatrik Endokrinoloji ve Diyabet Bölümü, Kiel/Almanya	Misafir Araştırma Görevlisi,
2008	Max-Planck Institute for Plant Breeding Research, Köln/Almanya	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1-Yasin Şimşek, **Seher Polat**, Felix G. Riepe, Halit Diri, Fatih Tanrıverdi, Züleyha Karaca, Kürşad Ünlühızarcı, Paul-Martin Holterhus, Fahrettin Keleştimur, "17-Alpha Hydroxylase Deficiency: A Rare Case of Primary Amenorrhea and Hypertension" Turkish Journal Of Endocrınology And Metabolısm, Case Report, DOI: 10.4274/tjem.2415, (2014).

2-**Polat S.,** Kulle A., Özdamar Karaca Z., Akkurt I., Kurtoğlu S., Keleştimur F., Grötzinger J., Holterhus P., Riepe F., "Characterisation Of Three Novel CYP11B1 Mutations in Classic And Non-Classic 11ß-Hydroxylase Deficiency", European Journal Of Endocrınology, 170, 697–706, DOI: 10.1530/EJE-13-0737, (2014).

3-Menabò S., **Polat S**., Baldazzi L., Kulle A., Holterhus P., Grötzinger J., Fanelli F., Balsamo A., Riepe F., "Congenital Adrenal Hyperplasia Due To 11-Beta-Hydroxylase Deficiency: Functional Consequences of Four CYP11B1 Mutations", European Journal Of Human Genetics, 22, 610–616; DOI:10.1038/EJHG.2013.197, (2014).

4-Dündar M., Kiraz A. , Emiroğullari E.F., Saatçi Ç., Taheri S., Başkol M., **Polat S.,** Özkul Y., "A Molecular Analysis Of Familial Mediterranean Fever Disease In A Cohort Of Turkish Patients. ", Annals Of Suudi Medicine, 32(4): 343-348, DOI: 10.5144/0256-4947.2012.343, (2012).

Kitap

1- "Current Applications of Biotechnology", Baş Editör : Munis DÜNDAR, Editör: Fabrizio Bruschi Kevan Gartland Mariapia Viola Magni Peter Gahan, Yusuf Deeni, Assistan Editor: Seher POLAT, Erciyes University Publication no 199, ISBN 978-605-85579-0-1, (2015).

Poster

1-**Polat S.,** Kulle A., Özdamar Karaca Z.C., Akkurt I., Kurtoğlu S., Grötzinger J., Keleştemur H.F., Holterhus P., Riepe F., "11ß-Hydroxylase Deficiency; Functional Characterisation Of Three Novel Cyp11b1 Mutations ", 9th Joint Meeting of Paediatric Endocrinology, Hormon Research, (suppl 1), ss 78, (2013).

2-**Polat S.,** Karabulut S.Y., Bahadir O., Dündar M., The increasing importance of Medical Genetics in Turkey, Current Opinion in Biotechnology**,** DOI: 10.1016/j.copbio.2011.05.105, (2011).

3-M Dundar, **S Polat**, EF Emirogullari, S Taheri, A Kiraz, C Saatci, Y Ozkul "MEFV Gene Mutation Screening in Turkish Population", Clinical Genetics, ss 78, (2010).

4-EF Emirogullari, S Taheri, **S Polat**, A Kiraz, G Zarasiz, C Saatci, Y Ozkul, M Dundar "Investigation of PAI-1 4G/5G Polymorphism in Turkish FMF Patients", Clinical Genetics, ss 78-87, (2010).