T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

HİRSUT/HİPERANDROJENEMİLİ KADIN HASTALARDA FENOTİP-GENOTİP İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Proje No:
TCD-2014-5098

Proje Türü
Çok Disiplinli Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof.Dr. Fahrettin KELEŞTEMUR
Endokrinoloji Bilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı
Birimi/Bölümü
Araş. Gör Seher POLAT- Tıbbi Genetik AD
Prof.Dr. Kürşad ÜNLÜHIZARCI- Endokrinoloji Bilim Dalı
Doç.Dr.Züleyha KARACA- Endokrinoloji Bilim Dalı
Uzman.Dr. Sülbiye KARABURGU
Prof.Dr. Munis DÜNDAR- Tıbbi Genetik AD
Prof.Dr. Yusuf ÖZKUL- Tıbbi Genetik AD

Aralık 2015

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Proje konusunun belirlenmesinde ve yapımında manevi ve bilimsel desteğini esirgemeyen tüm proje ekibine ve projenin yapımında maddi kaynak sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. GİRİŞ/AMAÇ VE KAPSAM 12
3. GEREÇ VE YÖNTEM 21
3.1. Çalışma Grubu..... 21
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler 21
3.2.1. Cihaz-Alet Listesi ve Üretici Firmalar 21
3.2.2. Sarf Malzemele Listesi ve Üretici Firmalar 22
3.3. Hasta Veri ve Materyallerinin Toplanması 23
3.3.1. Klinik Tanı ve Kriterleri 23
3.3.2. DNA İzolasyonu ve Aday Genler..... 24
3.4. DNA Dizi Analizi..... 24
3.4.1. PCR ve PCR Ürünü Temizlenmesi 24
3.4.2. Sekans PCR ve PCR Ürünün Temizlenmesi 25
3.4.3. ABI3500 Genetik Analizatör Cihaz Ayarları ve Sonuçların Analizi 27
4. BULGULAR 28
4.1. Hasta Tanıları 28
4.2. Kadın Gönüllülerde CYP11B1, CYP21A2, 3βHSD2 ve AR Genlerinde Belirlenen Değişimler ve Sıklığı 28
4.2.1. CYP21A2 Geninde Belirlenen Değişimler 28
4.2.2. CYP21A2 promotör Bölgesi Değişimleri 31
4.2.3. CYP11B1 Geninde Belirlenen Değişimler 33
4.2.4. 3βHSD2 Geninde Belirlenen Değişimler..... 34
4.3. Kadın Gönüllülerde CYP11B1, CYP21A2 ve 3βHSD2 Gen Değişimleri ve Tanıları 35
4.3.1. CYP21A2 Gen Değişimleri ve Hasta Tanıları 35
4.3.2. CYP21A2 Promotör Değişimleri ve Hasta Tanıları..... 37
4.3.3. *CYP11B1* Gen Değişimleri ve Hasta Tanıları 40
4.3.4. 3βHSD2 Gen Değişimleri ve Hasta Tanıları..... 42
4.3.5. Belirlenen Kombine Değişimler ve Hasta Tanıları 42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....45
5.1. Hasta Tanıları 45
5.1.1. Hirsutizm Şikâyeti ile Gelen Grup Tanıları 45

5.1.2. Şikâyeti Olmayan Gönüllü Grup Tanıları 46
5.2. Kadın Gönüllülerde *CYP11B1, CYP21A2* ve *3βHSD2* Genlerinde Belirlenen Değişimlerin Özellikleri ve Klinik Bulgular Üzerine Olan Etkileri 48
5.2.1 *CYP21A2* Geninde Belirlenen Değişimler 48
5.2.2. *CYP11B1* Geninde Belirlenen Değişimler 59
5.2.3. 3βHSD2 Geninde Belirlenen Değişimler 67
5.3. CYP21A2, CYP11B1, HSD3B2 Genlerinde Meydana Gelen Değişimler ve Hasta Tanılarının Karşılaştırılması/İstatistiki Verilen Değerlendirilmesi 67
5.3.1. Çalışma Grupları ve Hasta Tanılarına Göre *CYP21A2, CYP11B1* ve *3βHSD2* Genlerine Ait Patolojik Değişimlerin Taşıyıcılık Durumu 68
5.3.2. Hasta Tanılarına Göre *CYP21A2, CYP11B1* ve *3βHSD2* Genlerine Ait Patolojik Değişimler 70
6. KAYNAKLAR 72

ÖZET

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 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. 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.

ABSTRACT

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. 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.

1. GİRİŞ/AMAÇ VE KAPSAM

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 ile belirlenen 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- 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

Steroid hormon sentezi, kolestrolden biyolojik olarak aktif olan steroid hormonların üretimini kapsayan işlev olup, meydana geldiği endokrin bezlerde ortak hatlara sahip olmasına rağmen, hücre tipine özgü varyasyonlar göstermektedir, dolayısı ile steroid hormon üretiminde yer alan çeşitli enzimlerin ve kofaktörlerin biyokimyası ve enzimleri kodlayan genlerin düzenlenişlerinin anlaşılması steroid hormon üretimin ve fonksiyonunun anlaşılmasına ışık tutacaktır. Üretilen steroid hormonların kalitatif özellikleri faklı enzimler ve onları düzenleyen kofaktörler tarafından belirlenmektedir. Sentezde yer alan enzimler, sahip oldukları protein yapısı, kofaktörleri ile olan bağlantı şekilleri, katalizlediği reaksiyonlar, elektron kaynakları çift ya da tek yönlü olarak sentezde rol almaları ve hücre içerisindeki lokalizasyonlarına göre sitokrom 450 (CYP450) ve hidroksisteroid dehidrogenaz (HSD) olmak üzere iki gruba ayrılmakta (Tablo 1.1), bu iki grup sırası ile kendi içerinde sırası ile Tip1 (mitokontriye ait) ve Tip2 (endoplazmik retikuluma ait) ve aldo-keto redüktaz (AKR) veya kısa-zincir dehidrogenaz redüktaz (SDR) ailesine ait olabilmektedir.

Steroid hormonlar; mineralokortikoid (örn. aldosteron), glukokortikoid (örn. kortizol), her iki cinste üretilen erkeklik hormonları; androjen, (örn. testosteron, DHEA, androstenedion) 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. Dolayısı ile sentez yolağında meydana gelen bozukluk derecesine, bozukluğun kaynağına bağlı olarak geniş spektrumda klinik ve biyokimyasal bulgular vermektedir. Yolakta yer alan enzimlerin ve ara ürünlerin birbirine benzerlikleri, kısmen de olsa aynı fonskiyona sahip olmaları, farklı düzenlenmelerine rağmen over, testis ve böbrek üstü bezlerde steroid sentez yolağında yer alan ortak genlerin mevcudiyeti hastalığın ya da klinik bulgunun etiyolojisinin anlaşılmasında karışıklıklara yol açmaktadır.

Üreme çağındaki kadınların %5-10'luk bir dilimini etkileyen hirsutizm (5) başlıca hiperandrojenik semptom olup, androjene hassas bölgelerde erkek tipi kıllanma olarak tanımlanmaktadır (6). Hirsutizm, dolaşımda yer alan androjen seviyesindeki artış ya da kıl köklerinde androjene olan hassasiyet artışından kaynaklanmaktadır. Karaca ve ark., 2012 tarafından yapılan çalışmada hirsutizm şikayeti ile gelen hastaların detaylı analizleri

yapıldığında, bu hasta grubunun %79'unun polikistik over sendromu (PKOS), %13'unun idiyopatik hiperandrojenizm (IHA), %6 idiyopatik hirsutizm (IH) ve %2'sinin non-klasik konjegenital adrenal hiperplazi (NKAH) tanısı aldığı belirlenmiştir (7).

Üreme çağındaki kadınların %5-10'luk bir dilimini etkileyen PKOS, hiperandrojenizm/hiperandrojenemi ile karakterize edilen endokrin bozukluk olup, ovülasyonda meydana gelen bozukluklar infertilite, adet düzensizliği ve polikistik overler oluşmasına neden olmaktadır. PKOS'lu hastalar diyabet ve kalp hastalıklarına yakalanmaya karşı artan risk gösterirler. PKOS, etiyolojinin net olarak bilinmemesine rağmen genetik temel ihtiva eden çok faktörlü hastalıklar içerisine dahil edilmektedir. PKOS'da hiperandrojenizme neden olan mekanizma net olarak bilinmemekle birlikte, hastaların farklı klinik bulgular sergilemesi beklenen bir durumdur. PKOS'lu hastalarda böbrek üstü bezlerinden salınan adrojen miktarında artışın da olduğu yönünde bir çok çalışma mevcuttur. Primer olarak böbrek üstü bezlerinde üretilen DHEAS'ın yaklaşık %50 PKOS hastasında artış gösterdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan gerek bizim çalışmalarımızda gerekse farklı grupların çalışmalarında 17-OH progesteronun (17OHP) PKOS'lu hastalarda ACTH uyarılmasına karşı cevabın oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Insülin direncinin böbrek üstü bezlerde ki ACTH uyarılmasına karşı hassasiyet gelişmesine neden olduğu yönündeki çalışmaların varlığına rağmen, kendi çalışmalarımızda bu hipotezi doğrulayan veri elde edilmemiştir (8, 9) PKOS hastalarında 21-hidroksilaz gibi böbrek üstü bezlerdeki enzimatik bozuklukların varlık ihtimali yapılan hormonal ölçümlerlede desteklenmektedir. ACTH uyarılmasına olan artmış kortizol cevabının altında yatan moleküler neden bilinmemekte olup, belirlenemeyen hafif steroid biyosentez yolak defektlerinin varlığı nedenlerden bir tanesi olabilir. Hirsutizm ve hiperandrojenemi semptomları taşıyan kadınların büyük bir çoğunluğu PKOS tanısı almıştır (10, 11). CYP21A2 geninde PKOS ilişkili mutasyon ve/polimorfizim (12) ve 3βHSD2 ile ilişkili ekspresyon ve bağlantı analizleri (13) üzerine yapılan çalışmalar mevcut olmasına rağmen, PKOS hastalarında 3βHSD2 ve CYP11B1 mutasyon ve/veya polimorfizim taraması üzerine çalışma mevcut değildir. Diğer tarftan mevcut olan çalışmalar belirli SNP (tek nükleotid polimorfizm) üzerine yoğunlaşmakta olup, daha kapsamlı gen bölgelerin (proksimal ve kor promoter, intron-ekzon bağlantı ve protein kodlayan bölgeler) analizini kapsamamaktadır.

Hiperandrojenizm/hiperandrojenemi kadınlarda üreme evresinde en sık raslanan endokrinopati olup, heterojen hastalık grubununu içermektedir (14). Hiperandrojenizm, hirsutizm, akne, androjenik alopesi (AGA) ve sebore gibi androjene bağlı olarak gerçekleşen

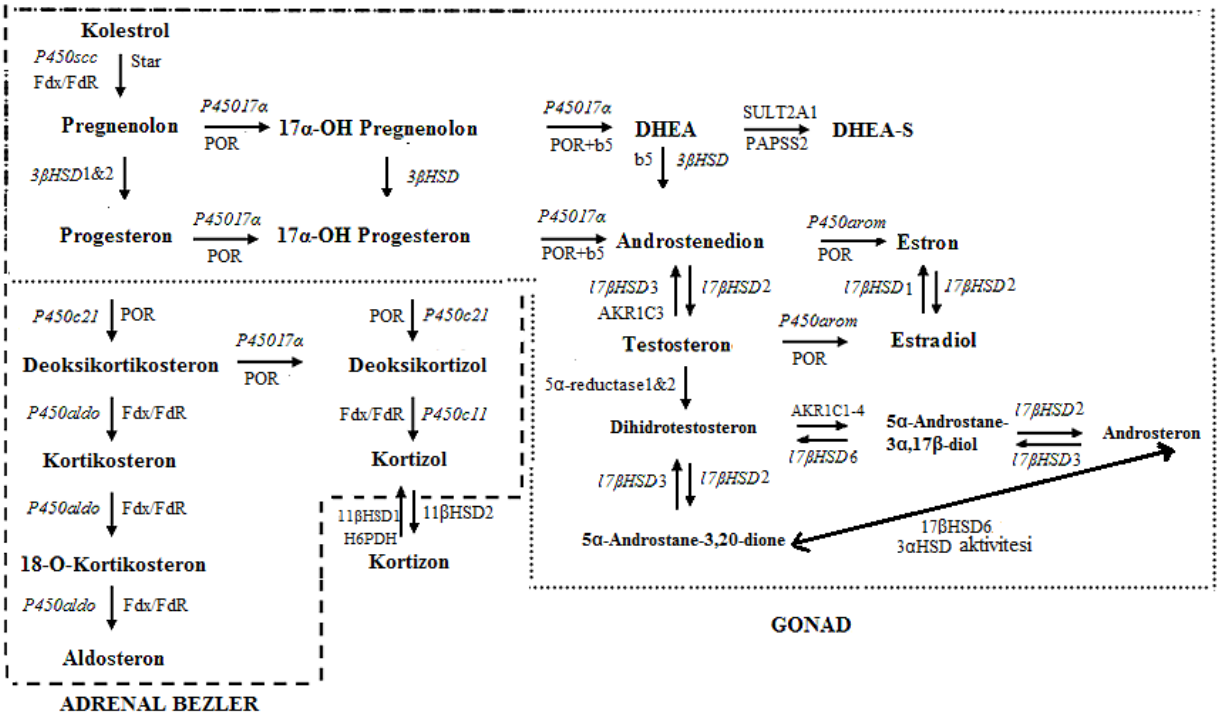
klasik bulguları tanımlayan terimdir. Üreme dönemindeki kadınlarda yaygın olmasına rağmen (15) klinik bulguları, androjen fazlalığı olan kadınlar arasında geniş heterojenite göstermektedir. Diğer taraftan androjen fazlalığının neden olduğu bulgular ya da derecesi spesifik olarak androjen kaynağını göstermemekte, ayrıca hiperandrojenite semptomları normal serum androjen seviyelerinde meydana gelebilmektedir. Idiyopatik hiperandrojenizm (IHA) olarak tanımladığımız diğer bir grup, androjen fazlalığı ile karakterize fakat düzenli ovulasyon döngüsüne ve normal over görünümüne sahip kadın hastalarda belirlenmiştir. Bu grup kadınlarda androjen fazlalığının kaynağının araştırılmasına dönük yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Daha önce, tarafımızdan yapılan çalışmada adrenal bezlerde meydana gelen androjen artışının androjen kaynağını oluşturabileceği yönündedir (16).

Hirsutizmin diğer yaygın nedeni "idiyopatik hirsutizm (IH)" olup, normal androjen seviyelerinde, düzenli ovulasyon ve normal over görünümüne sahip hastalarda ortaya çıkmaktadır. Her ne kadar androjen seviyeleri yöntemin verdiği referans aralığında bulunsa da, daha önce yaptığımız çalışmada sağlıklı populasyona göre yüksek düzeylerde olduğu belirlenmiştir (17). IH ve IHA hastalarında, ACTH uyarı testine 17-OH progesterone cevabı, NKAH hastalarının da alınan cevaba benzer olduğu için, yine bu grup hastalarda da adrenal steroid hormon sentez defektlerinden şüphe etmekteyiz. Hirsutizm her ne kadar genellikle zararsız, fonksiyonel bir anomali olarak değerlendirilsede, hayatı tehdit edebilecek nitelikte olan tümörlerin görünen öncü habercisi olabilme özelliğine de sahiptir. IH hastalarında yapılan çalışmaların çoğunluğu testosteronun periferdeki dönüşümü ya da kullanımı üzerinedir (5) (18) (19). Planlanan çalışmamızda böbrek üstü bezlerde meydana gelebilecek olan defektler üzerine yoğunlaşacaktır.

CYP21A2 (P450c21) gen allelerinde meydana gelen mutasyonlar 21-hidroksilaz (21OH) eksikliğini konjenital adrenal hiperplaziye (KAH) neden olmakta ve bilinen KAH'ların %90'ını oluşturmaktadır. 21-OH aktivitesinde meydana gelen farklı seviyedeki aktivite kaybı değişik klinik ve fenotipik varyasyonlara neden olmaktadır. KAH'ın non-klasik formu 21-OH'ki kısmi aktivite kaybından kaynaklanmaktadır. CYP21A2 geninde meydana gelen mutasyonların primer kaynağı psödogen (yalancı gen), CYP21A1P varlığı olup, CYP11A2 gibi 10 ekzondan meydana gelmekte ve CYP21A2 ile ekzonik bölgelerde 98%, intronik bölgelerde %96 homolojiye sahiptir (20). P450 tip II gen ailesine ait olan CYP21 geni 6. kromozomun kısa kolu üzerinde, CYP21A1P ile aynı genomik rekombinasyon sıklığının yüksek olduğu bölgede lokalize olduğundan dolayı bilinen mutasyonların yaklaşık %90'ı CYP21A1P kaynaklı, geri kalan de novo olarak meydana gelmektedir (21). Psödogenin sahip

olduğu promoter bölgesi, aktif gen promotöründen %80 daha az aktiviteye sahip olup, iki promöter arasındaki mikrokonversiyonlar aktif gende aktivite kaybına neden olmaktadır (22). KAH hastalarının yaklaşık olarak 5–8%'i CYP11B1 (P450c11B) geninde meydana gelen mutasyon sonucu aktivite kaybı kaynaklı olup, NKAH'a neden olan CYP11B1 mutasyonlarının sıklığı bilinmemektedir. 11BOH eksikliğinin neden olduğu NKAH, hafif virilizasyon, çocuklarda erken yalancı ergenlik ve kadınlarda PKOS'u destekleyen semptomlarla kendini gösterebilir (23). Non-klasik 11BOH, CYP11B1 fonksiyonundaki kısmi bozukluktan kaynaklanmasına rağmen (24, 25) neden olduğu fenotipik bulgular doğrultusunda 21OH eksikliği ile ortaklık göstermektedir (26). CYP11B1 geni, P450 Tip I gen ailesine ait olup, yüksek homolojiye sahip olduğu CYP11B2 geni ile 40kb'lik mesafede yer almaktadır. İki gen arasındaki yüksek homoloji, eşit olmayan parça değişimi (non-equal crossing-over) kaynaklı, CYP11B1 fonskiyonunda kayıplara ve dolayısı ile KAH'a neden olmaktadır (27). 3ßHSD2 geni, yüksek homolojiye sahip olduğu 3ßHSD1 geni ile yakın mesafede 1. kromozom üzerinde lokalizedir. Mutasyona bağlı eksikliği, adrenal bezlerde gerçekleşen bütün steroid hormon yolaklarını (glukokortikoid, mineralokortikoid, cinsiyet hormonları) etkilediği gibi gonadlarda meydana gelen steroid üretimini de etkilemektedir (Şekil1.1).Genotipe bağlı olarak geniş spektrumlu klinik vermekte, non-klasik formu hirsutizm ve menstrual düzensizlik ile kendini göstermektedir (28).

Yaptığımız meta analiz çalışmasında hirsutizm şikayeti ile gelen hastaların yaklaşık 1-8%'inin 21OH eksikliğine bağlı NKAH olduğu tesbit edilmiştir (29). Ayrıca 11BOH eksikliğine bağlı NKAH sıklığının batı toplumlarına kıyasla Türk populasyonlarında yüksek olduğu daha önce rapor edilmiş olup (30), CYP11B1 mutasyonuna bağlı NKAH, Türk yetişkin kadın hastada tanımlanmıştır (25). NKAH'ın klinik olarak verdiği semptomlar diğer hiperandrojenik hastalıkların (PKOS veya IHA) verdiği bulgulardan net olarak farklılaşmamaktadır (31).



Şekil 1.1. Major steroid hormon biyosentez yolağı. Yolakta yer alan anahtar enzimler ve enzim kofaktörleri ok işareti ile gösterilmiştir.

Enzim	Gen	Gen Büyüklüğü(kb)	Kromozom Lokalizasyonu	Ekzon (n)	mRNA Büyüklüğü(kb)
StAR	*STAR*	8	8p11.2	8	1.6
P450scc	*CYP11A1*	30	15q23-q24	9	2.0
P450c11β	*CYP11B1*	9.5	8q21-22	9	4.2
P450c11AS	*CYP11B2*	9.5	8q21-22	9	4.2
P450c17	*CYP17A1*	6.6	10q24.3	8	1.9
P450c21	*CYP21A2*	3.4	6p 21.1	10	2.0
P450aro	*CYP19A1*	130	15q21.1	10	1.5–4.5
3βHSD1	*HSD3B1*	8	1p13.1	4	1.7
3βHSD2	*HSD3B2*	8	1p13.1	4	1.7
11βHSD1	*HSD11B1*	7	1q32-q41	6	1.6
11βHSD2	*HSD11B2*	6.2	16q22	5	1.6
17βHSD1	*HSD17B1*	3.3	17q11-q21	6	1.4, 2.4
17βHSD2	*HSD17B2*	63	16q24.1-q24.2	5	1.5
17βHSD3	*HSD17B3*	67	9q22	11	1.2
17βHSD6 (RODH)	*HSD17B6*	24.5	12q13	5	1.6
AKR1C1	*AKR1C1*	14.3	10p14-p15	9	1.2
AKR1C2	*AKR1C2*	13.8	10p14-p15	9	1.3
AKR1C3	*AKR1C3*	13.0	10p14-p15	9	1.2
AKR1C4	*AKR1C4*	22.1	10p14-p15	9	1.2
5α-Reductase 1	*SRD5A1*	36	5p15	5	2.4
5α-Reductase 2	*SRD5A2*	56	2p23	5	2.4
SULT2A1	*SULT2A1*	17	19q13.3	6	2.0
PAPSS2	*PAPSS2*	85	10q24	13	3.9
P450-oxidoreductase	*POR*	69	7q11.2	16	2.5
Ferredoxin	*FDX1*	35	11q22	5	1.0, 1.4, 1.7, 3.2
Ferredoxin reductase	*FDXR*	11	17q24-q25	12	2.0
Cytochrome b_5	*CYB5A*	32	18q23	5	0.9
H6PDH	*H6PD*	36.5	1p36	5	9.1

Tablo 1.1. Steroid hormon üretiminde yer alan genlerin fiziksel özellikleri.Araştırılması planlanan genlerin altı çizilerek vurgulanmıştır.

Gen ailelerinin genel özelliklerinin bilinmesine rağmen, aileler içerisinde yer alan genlerin kodladığı enzimleri farklı kılan, biyokimyasal yapıları, substrata bağlanma, tanıma yetileri, substarata olan affiniteleri, reaksiyon hızları ve yönleri (iki ya da tek yönlü) net olarak bilinmemektedir. Bu belirsizliğe katkı primer olarak gen üzerinde bulunan mutasyonların *in vitro* olarak çalışılması ve gerek hasta kliniği, gerekse fonksiyonel çalışma referans alınarak yapılan *in silico* modellemeler eşliğinde sağlanmaktadır. Genler üzerindeki mutasyonların ve neden olduğu durumların belirlenmesi, enzimlerin biyokimyasal ve fonksiyonel yapısı, proteine özgü domainlerin daha net anlaşılması için önem arz etmektedir. Planlanan çalışmanın, bir sonraki basamakta yapılacak olan fonksiyonel analizlere temel oluşturması amaçlanmaktadır.

Yapılan çalışmalarda 17OHP birikiminden dolayı 21OHD hastalarında 5 α-redüktaz tip 1&2 ve alt basamakta yer alan enzim kaynaklı DHT (dehidrotestosteron) sentezinde artma belirlenmiştir (32). Diğer taraftan, CYP11B1'de meydana gelen defekt sonucu artan 11-deoksikortikosteronun, alternatif bir yolakla CYP17A1 tarafından kodlanan 17,20 liyaz enzimi tarafından androstenedion'a dönüştürüldüğü düşünülmektedir (9, 33) Adrenal bezler alternatif yolakların kullanımı için gerekli bütün enzimleri ihtiva etmekte olup, her iki durumda adrenal bezlerdeki defektlerin androjen artışına neden olabileceği yönündeki bulguları güçlendirmektedir.

3βHSD2 enzimi CYP17A1 ile olan substrat rekabetinden dolayı, aktivite kaybı ya da artışının primer olarak adrenallerde sentezlenen DHEAS/DHEA üretimini arttıracağı, buna karşılık CYP11B1ve CYP21A2 gibi adrenal spesifik (34) enzimlerinde meydana gelen aktivite azalışının enzim 11-deoksikortikosteron, deoksikortizol ve progesterone gibi enzim substratlarının artışı dolayısı ile androjen sentezine yöneleceği için üç gende mutasyon/polimorfizim çalışılmasının yapılması amaçlanmıştır. Heterozigot olarak ortaya çıkan CYP21A2 mutasyonlarının kadınlarda klinik olarak bulgu veren hiperandrojenemiye neden olabileceği yönünde çalışmalar olup, net bir data mevcut değildir (35) (36, 37). Planlanan çalışmada bu hipoteze katkı yapmak da amaçlanmıştır. Dolayısı ile aktivite değişikliklerine protein kodlayan bölgelerde meydana gelen polimorfizim kaynaklı olabileceği gibi promoter bölgesindeki (çalışmamızda proksimal ve kor promoter göz önüne alınacaktır) (38-40) baz değişimleri kaynaklı da olabileceği için çalışmamızda her iki bölge, aday genlerin tamamında taranacaktır.

Mutasyon ve/veya polimorfizm 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 geldiği 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.

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. 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 (41).

Türk kadın populasyonunda, aday genler göz önüne alınarak dizi analizi hirsutizm ve IHA'lı kadın hastalarda şu ana kadar yapılmamış olup, bu çalışma hasta ve kullanılacak olan kontrol grubu göz önüne alındığında, literatürdeki en geniş kapsamlı çalışma olacak ve Türk populasyonunda aday genlerde yer alan yaygın mutasyonların (founder effect) belirlenmesine ve bu doğrultuda analizlerin rutinde çalışılması ve uygun genetik danışmanlığın verilmesine öncü olacak ve katı sağlayacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dekanlığı 04.04.2014 tarihli, 2014/238 karar numaralı etik kurul onay belgesinin temini ile projenin çalışılmasına fiilen başlanmıştır. 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 katılımıcıya 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 Transilluminatör	Vilber Lourmat
Doğru Akım Güç Kaynağı	Biorad
Hassas Terazi	Libror AEG-220
Dondurucu (-20°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 2.3'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 (42).

Tablo 2.3. *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°C, nisbeten uzun dönemde -20°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 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 2.4). *CYP21A2* geni ve promotör bölgesi birer, *CYP11B1* ve *3βHSD2* geni üç ayrı PZR reaksiyonunda çoğaltılmıştır.

PZR reaksiyonları, *CYP21A2* geni için Hifi Platinium DNA Taq polimeraz, *CYP11B1* ve *3βHSD2* genleri için Platinium Taq polimeraz 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. 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 2.4. *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°C	2935pb
Promotör	5' TTCAGGCGATTCAGGAAGGC 3' 5' CAGAGCAGGGAGTAGTCTC 3'	56°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°C'yi takiben 15dk 85°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°C bağlanma sıcaklığı ve uzama basamağı 60°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.

3.4.3. 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.

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.

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.

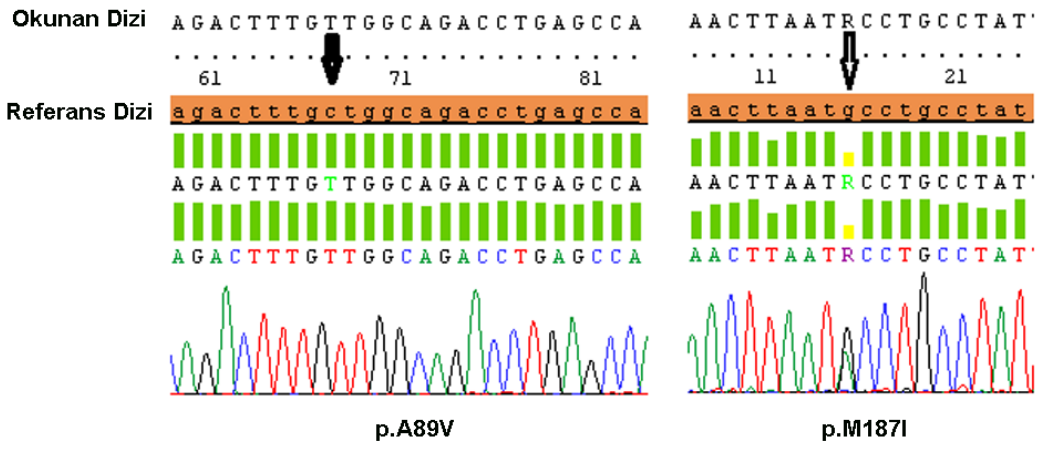
Normal popülasyondan çalışmaya katılan 270 premenapozal kadından, 172 birey normal (%63.7), 43 birey PKOS (%15.9), 12 birey IHA (%4.4), 7 birey IH (%2.6) ve 29 birey izole androjen yüksekliği (%10.7), 2 birey NKAH (%0.7) tanısı almıştır. OKS kullanımında olan 5 birey (%1.8) OKS'nin tanı kritelerlerini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

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

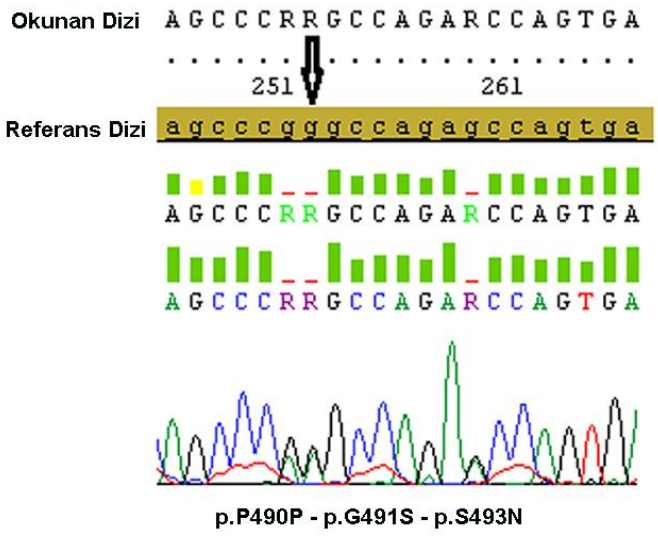
Çalışmaya katılan gönüllülerde belirlenen genetik değişimler bireylerde belirlenen yalın ve kombine değişimler olarak belirlenen birey sayısı ile birlikte verilmiştir.

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

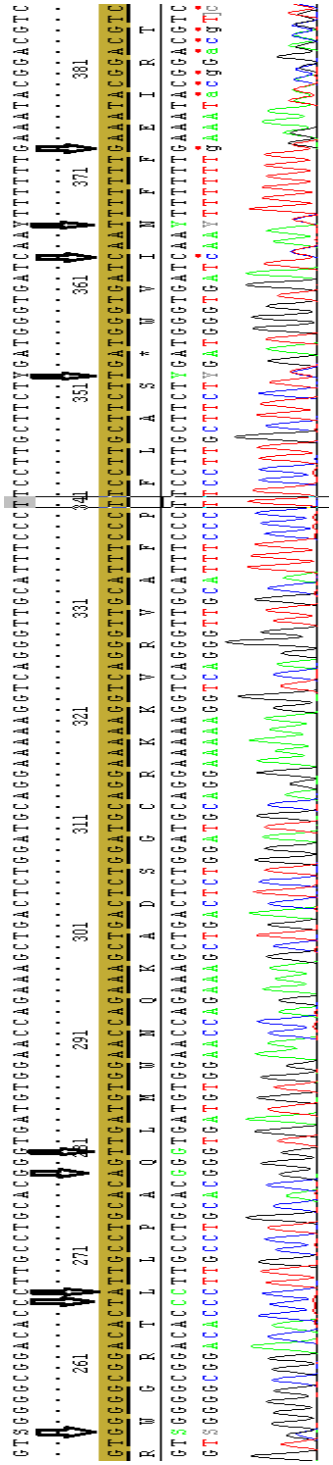
Proksimal promotör bölgesi için analiz edilen 392 gönüllüden 50 bireyde 19 farklı promotör değişimi belirlenmiş olup belirlenen değişimler Tablo 4.3'de listelenmiştir. Belirlenen 8 farklı değişim sadece bir baz üzerinde meydana gelen değişimleri ihtiva ederken belirlenen diğer değişimler promotör üzerinde 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

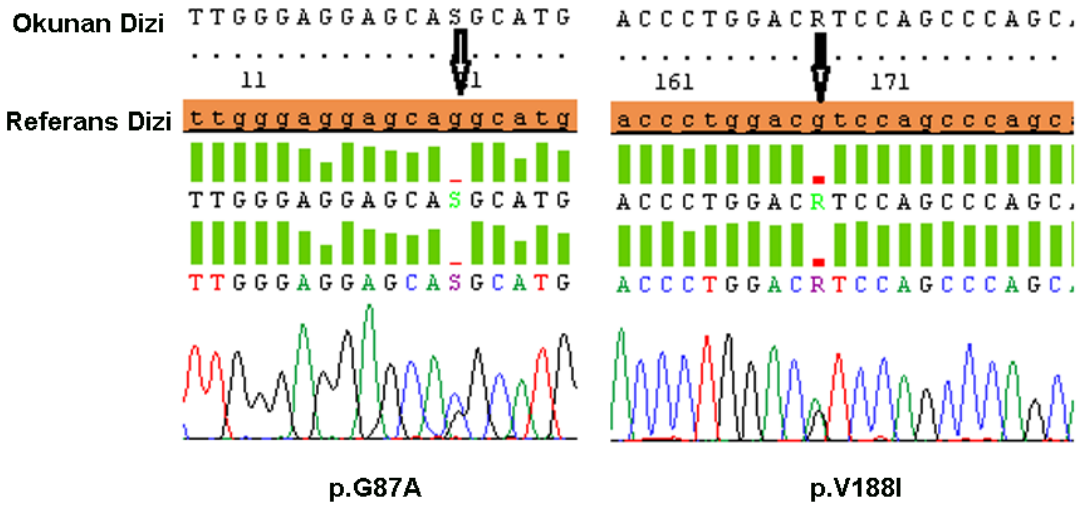
Nd: Bilinmiyor, n: Birey sayısı.



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.*

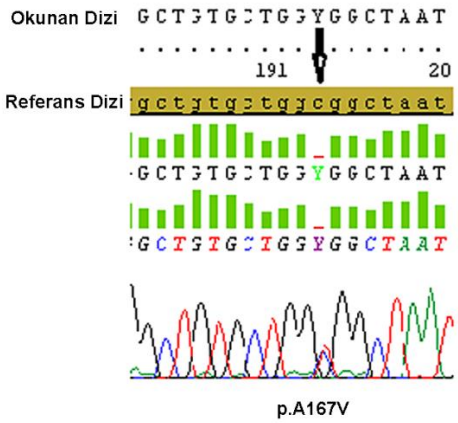
CYP11B1	Değişimin ismi	Referans	Mutant	Mutasyon Grubu	Klinik Etki	Homozigot (n)	Heterozigot (n)	Wt (n)
Ekzon 1	p.L16L	C	T	Sessiz	Nd	0	1	391
	***p.R43Q**	G	A	YA	Patolojik	1	45	346
	p.G46G	C	T	Sessiz	Nd	0	3	389
	***p.D63H**	G	C	YA	Patolojik	0	1	391
	p.L75L	A	G	Sessiz	Nd	171	178	43
Ekzon 2	p.Y81Y	C	T	Sessiz	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.

4.3. 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 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	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	1	2	0	0	0	0	0

Heterozigot							
-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	PKOS (n:1)

		T>C,-210 T>C,-282T>G,-284 A>G,-295 A>C,-296 T>C,-308 G>C	
	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.

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 belirlenmiştir.

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) (43).

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 (44). 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 (45). Androjen fazlalığı bulguları ile ilişkili şikayetleri olan grup ile İngiltere populasyonunda yapılan çalışmada 873 kadın hastada PKOS sıklığı %82 olarak belirlenmiştir (46).

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 (47). Türk kadın popülasyonunda yapılan benzer bir çalışmada hirsutizm

şikayeti ile gelen 105 kadın hastada idiyopatik hirsutizm sıklığı 14 birey ile %13 olarak belirlenmiştir (45). Androjen fazlalığı bulguları ile ilişkili şikayetleri olan grup ile İngiltere popülasyonunda yapılan çalışmada 873 kadın hasta idiyopatik hirsutizm sıklığı %4.7 olarak belirlenmiştir (46).

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 (45). 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 (46).

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 (48). 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 (49). 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 (50). 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 (45). Yaygın olarak kullanılan ACTH testinin yalnız pozitif sonuç verme olasılığı söz konusu olup (51, 52), NKAH tanısı için moleküler yöntemler tavsiye edilmektedir (49).

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 (43).

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 (53-55). Hirsutizme koyu tenli olan popülasyonlarda daha fazla rastlanırken, açık tenli olan ve doğulu kadınların ergenlik dönemlerinde daha az rastlanmaktadır (yaklaşık %30) (56, 57).

Normal popülasyon kullanılarak yapılan farklı çalışmalarda PKOS sıklığı, ABD popülasyonunda NIH'e göre %4 (58), Avrupa kökenli Kafkas popülasyonunda %6.5 (59), İran popülasyonunda NIH'e göre %7.1 aynı popülasyonda değer Rotterdam'a göre %14.6 (60), Filistin popülasyonunda NIH'e göre %7.3 (61), 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 (62). 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 (63). PKOS için konulan kesin ve yaygın kabul edilen tanı kriterlerinin mevcut olmamasının (59) yanı sıra menstrual düzensizlik, FGS için alınan sınır değerlerinin yapılan çalışma ve popülasyondan popülasyona göre farklılık göstermesi (58, 64) 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 (65-67) IHA'yı PKOS'un bir alt grubu olarak tanımlayan yayının (68) 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 (67). 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 (60), aynı grup tarafından 1002 gönüllü ile yapılan çalışmada %13 olarak belirlenmiştir (69).

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 (70).

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 (71).

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.

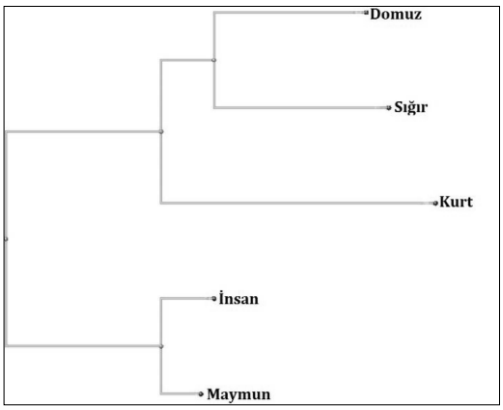
Tanılarından bağımsız olarak çalışmaya katılan 392 gönüllüde 68 heterozigotluk tespit edilmiş olup, *CYP21A2* genine ait Türk kadın popülasyonunda belirlenen patolojik allel taşıyıcılık (heterozigotluk) sıklığı %17.3 olarak belirlenmiştir. Sıklığın bu denli yüksek olmasının nedenleri arasında yüksek akraba evliliğine ilave olarak (72), *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.*

```
CYP21A2_İnsan    80 AMVKKWADFAGRPEPLTYKLVSRNYPDLSLGDYSLLWKAHKKLTRSALLLGIRDSMEPVVEQLTQEFCERMRAQPGTPVA 159
CYP21A2_Domuz    80 ALVRKWVDFAGRPQIPSYKLASQHCPDISLGDYSLFWKAHKKLTRSALLLGVRSSMEPRVEQLTQEFCERMRAQAGTPVT 159
CYP21A2_Kurt     80 AMVRKWVDFAGRPQTPSYKLVSLHHQDLSLGDYSLLWKAHKKLTRSALLLGIRSSMEPLVEQLTQEFCERMRAQAGTPVA 159
CYP21A2_Sığır    80 AMIRKWVDFAGRPQIPSYKLVSQRCQDISLGDYSLLWKAHKKLTRSALLLGTRSSMEPWVDQLTQEFCERMRVQAGAPVT 159
CYP21A2_Maymun   80 AMVKKWADFAGRPEPLTYKLVSKNYPDLSLGDYSLLWKAHKKLTRSALLLGMRDSMEPVVEQLTQEFCERMRAQAGTPVA 159
```

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 (73). 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 (73). 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 (74).

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 (75). 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 (73).

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 (76), 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 (77). 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 (78).

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 (75, 79). 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 (73).

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 (73). Tuz kaybettiren KAH hastalarında homozigot olarak belirlenirken, p.V281L gibi ılımlı değişimler ile kompound heterozigot olduğu durumlarda NKAH ile ilişkili olarak belirlenmiştir (77).

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 (73). Yapılan *in vitro* çalışmalar p.P453S değişimine sahip olan enzimin kalan enzimatik aktivitesini progesterona ve 17OHP için sırası ile %36 ve %44 olarak belirlenmiştir (80).

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 (73). 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 (79). Diğer taraftan p.Q481P değişimi bu bölgede kurulan hidrojen bağı ağına olumsuz etki ederek protein stabilizasyon kaybına ve dolayısı ile protein inaktivasyonuna neden olmaktadır (73). 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 (81). 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).

CYP21A2_İnsan	479	RLQPRGMGAHSPGQSQ---	494
CYP21A2_Domuz	478	RLQPRG----GRGEGPGPR	492
CYP21A2_Kurt	477	QLQPRGAGVLGRGQHP---	492
CYP21A2_Sığır	479	RLQPRGVEA-GAWESASAQ	496
CYP21A2_Maymun	480	WLQPRGLGVHSLGQSQ---	495

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 (82).

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 (83). Kopya sayısındaki değişimden kaynaklanan p.Q318X değişiminin sıklığı 38 heterozigot p.Q318X birey ile yapılan çaşılmada 32 kişi ile %84.2 olarak belirlenmiştir (83). Yapılan farklı bir çalışmada belirlenen 17 heterozigot p.Q318X değişiminin tamamı *CYP21A2* duplikasyonu kaynaklı olarak belirlenmiştir (84). 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 (85). Bu çalışmada, 1 bireyde heterozigot olarak belirlenmiştir. Bu değişimin homozigot formu SWKAH ile ilişkili olarak belirlenmiştir (85).

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 (86).

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 (87). *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 5.2). 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 3.6).

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 azalltığı için NKAH'a neden olduğu belirtilmiştir (88). 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 (89).

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 (90, 91).

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 3.1).

Belirtilen değişimlerin tamamı normalin varyantı olarak değerlendirilmekte ve enzim fonksiyonu üzerine olumsuz etkiye sahip olmadığı bilinmektedir (81). Buna zıt olarak p.N493S değişiminin patolojik olarak değerlendiren yayına ilave olarak (86), kombine homozigot değişimlerin enzim fonksiyonu üzerine olumsuz etki yapabileceğine dair görüşte mevcuttur (92). 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 (93).

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 3.17).

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 (94, 95). 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 3.3, 3.9 ve 3.10).

-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 (94, 96). Diğer taraftan -230 ve -1bp arasında yer alan promotör değişimlerinin mRNA ifadesinin %22'ye kadar azalttığı belirlenmiştir.

```
CYP21A2   -441  CCAGGCAAACCAGGCTTAAACTGTATTACTCTATCTGTAGCTTAAACTAACAAAC-AACC -361
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||
CYP21A1P  -442  CCAGGCAAACCAGGCTTAAACTGTATTACTCTATCTGTAGCTTAAACTAACAAACAAACC -362

CYP21A2   -360  CACACAAATCACATTTTGTTCTTCAGGCGATTCAGGAAGGCCTATTAGGCAGGGACTGCC -382
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CYP21A1P  -361  CACACAAATCACATTTTGTTCTTCAGGCGATTCAGGAAGGCCTATTAGGCAGGGACTGCC -383

CYP21A2   -381  ATTTTCTCTCTGAGACAAACATCATGCCAGTAAACTGGCCCACGGTGGGGTGGCAGAGGG -322
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CYP21A1P  -382  ATTTTCTCTCTGAGACAAACATCATGCCAGTAAACTGGCCCACGGTGGGGTGGCAGAGGG -323

CYP21A2   -321  AGAGGGCCCAGGTGGGGGCGGACACTATTGCCTGCACAGTTGATGTGGAACCAGAAAGCT -262
                ||||||||||||| |||||||||||  |||||||||| | ||||||||||||||||||||
CYP21A1P  -322  AGAGGGCCCAGGTCGGGGCGGACACCCTTGCCTGCACGGGTGATGTGGAACCAGAAAGCT -263

CYP21A2   -261  GACTCTGGATGCAGGAAAAAGGTCAGGGTTGCATTTCCCTTCCTTGCTTCTTGATGGGTG -202
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||
CYP21A1P  -262  GACTCTGGATGCAGGAAAAAGGTCAGGGTTGCATTTCCCTTCCTTGCTTCTCGATGGGTG -203

CYP21A2   -201  ATCAA-tttttttGAAATACGGACGTCCCAAGGCCAATGAGACTGGTGTCATTCCAGAAA -143
                || || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CYP21A1P  -202  ATTAATTTTTTTTGAAATACGGACGTCCCAAGGCCAATGAGACTGGTGTCATTCCAGAAA -143

CYP21A2   -142  AGGGCCACTCTGTGGGCGGGTCGGTGGGAGGGTACCTGAAGGTGGGGTCAAGGGAGGCCC -83
                |||||||||||||||| |||||||||||| || |||||| ||||||||||||||||||||
CYP21A1P  -142  AGGGCCACTCTGTGGGTGGGTCGGTGGGAAGGCACCTGAGGGTGGGGTCAAGGGAGGCCC -83

CYP21A2   -82  CAAAACAGTCTACACAGCAGGAGGGATGGCTGGGGCTCTTGAGCTATAAGTGGCACCTCA -23
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CYP21A1P  -82  CAAAACAGTCTACACAGCAGGAGGGATGGCTGGGGCTCTTGAGCTATAAGTGGCACCTCA -23

                                          +1
CYP21A2   -22  GGGCCCTGACGGGCGTCTCGCC/Atg
               |||||||||||||||||||||| |||
CYP21A1P  -22  GGGCCCTGACGGGCGTCTTGCC/ATG
```

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

(-196insT, -199 T>C, -210 T>C), (-282T>G, -284 A>G, -295 A>C, -296 T>C), (-282T>G, -284 A>G) ve (-295 A>C, -296 T>C, -308 G>C) değişimleri farklı kombinasyonlar ve farklı bölgeleri kapsayan CYP21A1P kaynaklı promotör konverisyonları olarak farklı bireylerde heterozigot olarak belirlenmiştir.

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 (97). 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.

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 (71) .

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 (72), 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

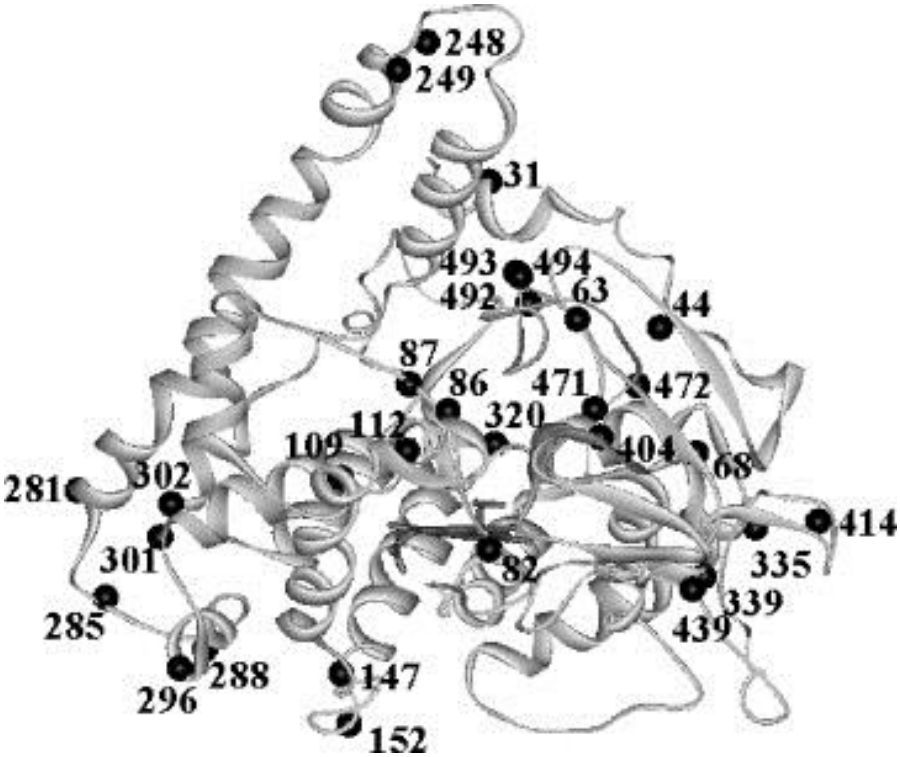
p.R43Q *CYP11B1* geninin 1. ekzonunda lokalize olup, 43. kodonun c.128'inci bazında meydana gelen CGG>CAG kaynaklıdır. Meydana gelen değişim *CYP11B1*'e özgü olan kodonun *CYP11B2*'ye özgü olan kodon ile değişimi ile sonuçlanmaktadır. A heliks üzerinde yer alan (98) bazik olan arjininin, glutamin ile 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 (99). Diğer taraftan 43. amino asit bölgesine en yakın bölge olan p.P42S değişiminin homozigot formunun NKAH'a neden oluğu belirlenmiştir (100).

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 (101). 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.*

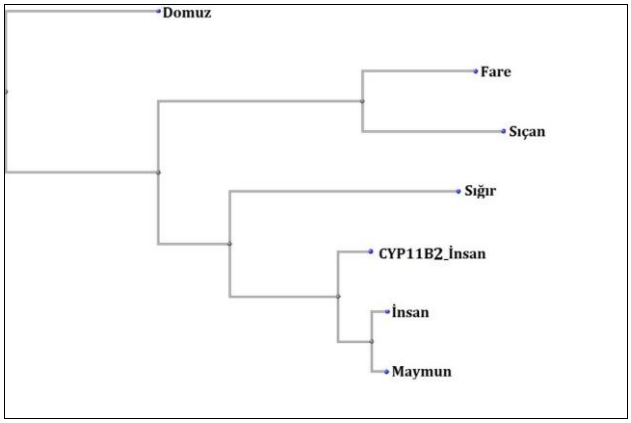
Kaynak: Lisurek and Bernhardt, 2004:215 (102).

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 (101).

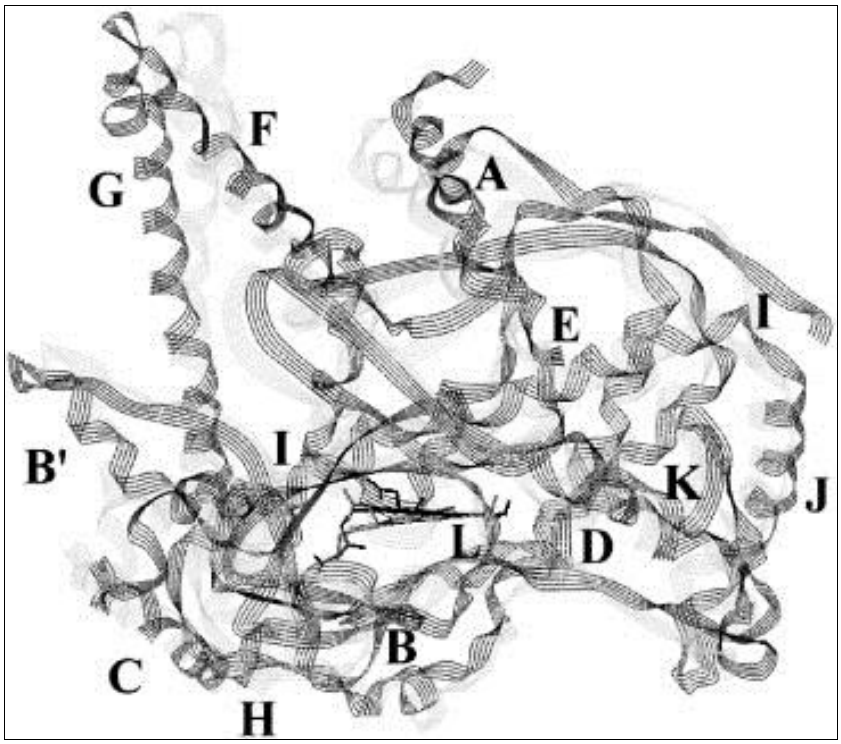
CYP11B1_İnsan	78	IFRYDLGGAGMVCVMLPEDVEKLQQVDSLHPHRMSLEPWVAYRQHRGHKCGVFLLNGPEWRFNRLRLNPEVLSPNAVQRF	157
CYP11B2_İnsan	78	IFRYNLGGPRMVCVMLPEDVEKLQQVDSLHPCRMILEPWVAYRQHRGHKCGVFLLNGPEWRFNRLRLNPDVLSPKAVQRF	157
CYP11B1_Maymun	78	IFRYDLGGAGMVCVMLPEDVEKLQQVDSLNPRRMSLEPWVAYRQHRGHKCGVFLLNGPEWRFNRLRLNPDVLSPRAVQRF	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 (103). 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 (102).

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 (99).

```
CYP11B1_İnsan     158  LPMVDAVARDFSQALKKKVLQNARGSLTLDVQPSIFHYTIEASNLALFGERLGLVGHSPSSASLNFLHALEVMFKSTVQL  237
CYP11B2_İnsan     158  LPMVDAVARDFSQALKKKVLQNARGSLTLDVQPSIFHYTIEASNLALFGERLGLVGHSPSSASLNFLHALEVMFKSTVQL  237
CYP11B1_Maymun    158  LPMVDAVARDFSQALRKKVLQNARGSLTLDVQPSIFHYTIEASNLALFGERLGLVGHSPSSASLSFLHALEVMFKSTVQL  237
CYP11B1_Domuz     159  LPMVDTVARDFSEALKQKVLQSAQGSLTMDMQPDIHKYTVEVSNFALFGERLGLFGCNPSSQSLKFIHALEAVFKTTTQL  238
CYP11B1_Fare      160  VPLVDGIARDFVDNLKKKMLESVHGSFSMDFQSSVFNYTIEASHFVLFGERLGLIGRDLSPDSLKFLHTLHSMFKTTTQL  239
CYP11B1_Sıçan     158  VPFVDVVARDFVENLKKRMLENVHGSMSINIQSNMFNYTMEASHFVISGERLGLTGHDLKPESVTFTHALHSMFKSTTQL  237
CYP11B1_Sığır     158  TPLVDGVARDFSQTLKARVLQNARGSLTLGHRAQLFRYTIEASTLVLYGERLGLLTQQPNPDSLNFIHALEAMLKSTVQL  237
```

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 (99).

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.

```
CYP11B1-İnsan     238  MFMPRSLSRWTSPKVWKEHFEAWDCIFQYGDNCIQKIYQELAFSRPQQYTSIVAELLLNAELSPDAIKANSMELTAGSVD  317
CYP11B2-İnsan     238  MFMPRSLSRWISPKVWKEHFEAWDCIFQYGDNCIQKIYQELAFNRPQHYTGIVAELLLKAELSLEAIKANSMELTAGSVD  317
CYP11B1-Maymun    238  MFMPRSLSRWTSPKVWKEHFEAWDCIFQYGDNCIQKIYQELALSRPQQYTSIVAELLLNAELSPDAIKANSMELTAGSVD  317
CYP11B1-Domuz     239  MFLPRSLSRWMRSQAWKEHFEAWDYISEYAENRIQKKYEELARGC-SQYNSIVANLMLQGNLPLRAMKANIMDLVAGSVD  317
CYP11B1-Fare      240  LYLPRSLTRWTSTRVWKENLESWDFISEYVTKCIKNVYRELAEGRPQSWS-VTAELVAERTLSMDAIQANSMELIAGSTD  318
CYP11B1-Sıçan     238  MFLPKSLTRWTSTRVWKEHFDSWDIISEYVTKCIKNVYRELAEGRQQSWS-VISEMVAQSTLSMDAIHANSMELIAGSVD  316
CYP11B1-Sığır     238  MFVPRRLSRWMSTNMWREHFEAWDYIFQYANRAIQRIYQELALGHPWHYSGIVAELLMRADMTLDTIKANTIDLTAGSVD  317
```

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 (104). *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 (105). 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 (104) rağmen bazı yayınlarda patolojik olarak (103) 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 (106, 107), zira belirlenen homozigot değişim klinik ve biyokimyasal olarak normal olan bireylerde ve Fransız popülasyonunda normalin varyantı olarak yaygın olarak bulunduğu belirlenmiştir (108). Farklı bir çalışmada p.V386A değişiminin, normal hamilelik geçiren grupta (n:24) bulunmaz iken preeklemsia geçiren grupta (n:42), 7 bireyde (%17) belirlenmesi (109) 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 (99) 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 (42). 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.

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 (71) 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 (110, 111), bu durum *HSD3β2* eksikliğinin hirsutizmin nadir nedenleri arasında olduğunu göstermektedir (112). 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.

4.2.3.1 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 (113). 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.

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/ hiperandroje- nemili 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.

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. Endocrine reviews 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. Endocrine reviews 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. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 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. Hormone research 2008; 70: 145-149.
5. Azziz R, Carmina E, Sawaya ME. Idiopathic hirsutism. Endocr Rev 2000; 21: 347-362.
6. 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.
7. 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 2012;
8. Colak R, Kelestimur F, Unluhizarci K, et al. A comparison between the effects of low dose (1 microg) and standard dose (250 microg) ACTH stimulation tests on adrenal P450c17alpha enzyme activity in women with polycystic ovary syndrome. Eur J Endocrinol 2002; 147: 473-477.
9. Kelestimur F,Sahin Y. Alternate pathway 17,20-lyase enzyme activity in the adrenals is enhanced in patients with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 1999; 71: 1075-1078.
10. 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.
11. 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.
12. Xita N, Georgiou I, Tsatsoulis A. The genetic basis of polycystic ovary syndrome. Eur J Endocrinol 2002; 147: 717-725.
13. 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.
14. Chen WC,Zouboulis CC. Hormones and the pilosebaceous unit. Dermatoendocrinol 2009; 1: 81-86.
15. Franks S. Polycystic ovary syndrome. N Engl J Med 1995; 333: 853-861.
16. Atmaca H, Tanriverdi F, Unluhizarci K, et al. Investigation of adrenal functions in patients with idiopathic hyperandrogenemia. Eur J Endocrinol 2006; 155: 307-311.
17. Unluhizarci K, Karababa Y, Bayram F, et al. The investigation of insulin resistance in patients with idiopathic hirsutism. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 2741-2744.
18. Caglayan AO, Dundar M, Tanriverdi F, et al. Idiopathic hirsutism: local and peripheral expression of aromatase (CYP19A) and 5alpha-reductase genes (SRD5A1 and SRD5A2). Fertil Steril 2011; 96: 479-482.
19. Escobar-Morreale HF, Carmina E, Dewailly D, et al. Epidemiology, diagnosis and management of hirsutism: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. Hum Reprod Update 2012; 18: 146-170.
20. 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.
21. White PC,Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Endocr Rev 2000; 21: 245-291.
22. 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.
23. 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.
24. 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.

25. 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.
26. Speiser PW,White PC. Congenital adrenal hyperplasia. N Engl J Med 2003; 349: 776-788.
27. 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.
28. Krone N,Arlt W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2009; 23: 181-192.
29. Unluhizarci K, Kaltsas G, Kelestimur F. Non polycystic ovary syndrome-related endocrine disorders associated with hirsutism. Eur J Clin Invest 2012; 42: 86-94.
30. Sahin Y,Kelestimur F. The frequency of late-onset 21-hydroxylase and 11 beta-hydroxylase deficiency in women with polycystic ovary syndrome. Eur J Endocrinol 1997; 137: 670-674.
31. New MI. Nonclassic 21-hydroxylase deficiency. Fertil Steril 2006; 86 Suppl 1: S2.
32. Kamrath C, Hochberg Z, Hartmann MF, et al. Increased activation of the alternative "backdoor" pathway in patients with 21-hydroxylase deficiency: evidence from urinary steroid hormone analysis. J Clin Endocrinol Metab 2012; 97: E367-375.
33. Auzeby A, Bogdan A, Touitou Y. An alternate pathway to androstenedione synthesis by human adrenals: evidence of a balance in 11 beta-hydroxylase and 17,20-lyase activities leading to androstenedione. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80: 1706-1711.
34. John ME, John MC, Ashley P, et al. Identification and characterization of cDNA clones specific for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450. Proc Natl Acad Sci U S A 1984; 81: 5628-5632.
35. Neocleous V, Shammas C, Phedonos AP, et al. Genetic defects in the cyp21a2 gene in heterozygous girls with premature adrenarche and adolescent females with hyperandrogenemia. Georgian Med News 2012; 40-47.
36. Soardi FC, Lemos-Marini SH, Coeli FB, et al. Heterozygosis for CYP21A2 mutation considered as 21-hydroxylase deficiency in neonatal screening. Arq Bras Endocrinol Metabol 2008; 52: 1388-1392.
37. Admoni O, Israel S, Lavi I, et al. Hyperandrogenism in carriers of CYP21 mutations: the role of genotype. Clin Endocrinol (Oxf) 2006; 64: 645-651.
38. Watanabe N, Kitazume M, Fujisawa J, et al. A novel cAMP-dependent regulatory region including a sequence like the cAMP-responsive element, far upstream of the human CYP21A2 gene. Eur J Biochem 1993; 214: 521-531.
39. Foti DM,Reichardt JK. YY1 binding within the human HSD3B2 gene intron 1 is required for maximal basal promoter activity: identification of YY1 as the 3beta1-A factor. J Mol Endocrinol 2004; 33: 99-119.
40. Cheng LC, Pai TW, Li LA. Regulation of human CYP11B1 and CYP11B2 promoters by transposable elements and conserved cis elements. Steroids 2012; 77: 100-109.
41. Collins AL, Lunt PW, Garrett C, et al. Holoprosencephaly: a family showing dominant inheritance and variable expression. Journal of medical genetics 1993; 30: 36-40.
42. 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.
43. 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. Fertility and sterility 2009; 91: 456-488.
44. 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. Fertility and sterility 2010; 94: 194-197.
45. Karaca Z, Acmaz B, Acmaz G, et al. Routine screening for Cushing's syndrome is not required in patients presenting with hirsutism. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies 2013; 168: 379-384.
46. Azziz R, Sanchez LA, Knochenhauer ES, et al. Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 2004; 89: 453-462.
47. Carmina E. Prevalence of idiopathic hirsutism. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies 1998; 139: 421-423.
48. New MI. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 2006; 91: 4205-4214.
49. Unluhizarci K, Kula M, Dundar M, et al. The prevalence of non-classic adrenal hyperplasia among Turkish women with hyperandrogenism. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology 2010; 26: 139-143.

50. Fanta M, Cibula D, Vrbikova J. Prevalence of nonclassic adrenal hyperplasia (NCAH) in hyperandrogenic women. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology 2008; 24: 154-157.
51. Azziz R, Rafi A, Smith BR, et al. On the origin of the elevated 17-hydroxyprogesterone levels after adrenal stimulation in hyperandrogenism. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 1990; 70: 431-436.
52. Vermesh M, Silva PD, Rosen GF, et al. Effect of androgen on adrenal steroidogenesis in normal women. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 1988; 66: 128-130.
53. 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.
54. Franks S. Polycystic ovary syndrome. The New England journal of medicine 1995; 333: 853-861.
55. Falsetti L, Gambera A, Andrico S, et al. Acne and hirsutism in polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine-metabolic and ultrasonographic differences. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology 2002; 16: 275-284.
56. 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. Fertility and sterility 1988; 50: 260-265.
57. Carmina E, Koyama T, Chang L, et al. Does ethnicity influence the prevalence of adrenal hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome? American journal of obstetrics and gynecology 1992; 167: 1807-1812.
58. 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. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 1998; 83: 3078-3082.
59. 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. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 2000; 85: 2434-2438.
60. 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.
61. 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.
62. Yildiz BO, Bozdag G, Yapici Z, et al. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. Human reproduction 2012; 27: 3067-3073.
63. March WA, Moore VM, Willson KJ, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. Human reproduction 2010; 25: 544-551.
64. 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. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 2006; 91: 1345-1350.
65. Unluhizarci K, Gokce C, Atmaca H, et al. A detailed investigation of hirsutism in a Turkish population: idiopathic hyperandrogenemia as a perplexing issue. Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association 2004; 112: 504-509.
66. 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.
67. Atmaca H, Tanriverdi F, Unluhizarci K, et al. Investigation of adrenal functions in patients with idiopathic hyperandrogenemia. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies 2006; 155: 307-311.
68. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Human reproduction 2004; 19: 41-47.
69. 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.
70. 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.
71. WEB_6.HGMD. The Human Gene Mutation Database. 2015;
72. Alper OM, Erengin H, Manguoglu AE, et al. Consanguineous marriages in the province of Antalya, Turkey. Annales de genetique 2004; 47: 129-138.

73. Haider S, Islam B, D'Atri V, et al. Structure-phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2013; 110: 2605-2610.
74. Capoluongo E, Concolino P, Vendittelli F, et al. Gene symbol: CYP21A2. Disease: Non-classic 21-Hydroxylase deficiency. Human genetics 2008; 123: 553.
75. 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.
76. 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.
77. New MI, Abraham M, Gonzalez B, et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2013; 110: 2611-2616.
78. Nikoshkov A, Lajic S, Holst M, et al. Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 1997; 82: 194-199.
79. 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. The Journal of biological chemistry 2012; 287: 10613-10622.
80. 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.
81. 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.
82. Globerman H, Amor M, Parker KL, et al. Nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency. The Journal of clinical investigation 1988; 82: 139-144.
83. 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. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 2009; 94: 3954-3958.
84. 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.
85. 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. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 2004; 89: 368-374.
86. Barbat B, Bogyo A, Raux-Demay MC, et al. Screening of CYP21 gene mutations in 129 French patients affected by steroid 21-hydroxylase deficiency. Human mutation 1995; 5: 126-130.
87. Chen JM, Cooper DN, Chuzhanova N, et al. Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease. Nat Rev Genet 2007; 8: 762-775.
88. 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. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 2000; 85: 4562-4567.
89. Ebersberger I, Metzler D, Schwarz C, et al. Genomewide comparison of DNA sequences between humans and chimpanzees. American journal of human genetics 2002; 70: 1490-1497.
90. Plotkin JB, Robins H, Levine AJ. Tissue-specific codon usage and the expression of human genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004; 101: 12588-12591.
91. Lampson BL, Pershing NL, Prinz JA, et al. Rare codons regulate KRas oncogenesis. Current biology : CB 2013; 23: 70-75.
92. Asanuma A, Ohura T, Ogawa E, et al. Molecular analysis of Japanese patients with steroid 21-hydroxylase deficiency. Journal of human genetics 1999; 44: 312-317.
93. 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.
94. Chin KK,Chang SF. The -104G nucleotide of the human CYP21 gene is important for CYP21 transcription activity and protein interaction. Nucleic acids research 1998; 26: 1959-1964.

95. Kagawa N,Waterman MR. Evidence that an adrenal-specific nuclear protein regulates the cAMP responsiveness of the human CYP21B (P450C21) gene. The Journal of biological chemistry 1991; 266: 11199-11204.
96. Araujo RS, Mendonca BB, Barbosa AS, et al. Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 2007; 92: 4028-4034.
97. Nandagopal R, Sinaii N, Avila NA, et al. Phenotypic profiling of parents with cryptic nonclassic congenital adrenal hyperplasia: findings in 145 unrelated families. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies 2011; 164: 977-984.
98. 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.
99. Barr M, MacKenzie SM, Wilkinson DM, et al. Functional effects of genetic variants in the 11beta-hydroxylase (CYP11B1) gene. Clinical endocrinology 2006; 65: 816-825.
100. Joehrer K, Geley S, Strasser-Wozak EM, et al. CYP11B1 mutations causing non-classic adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency. Human molecular genetics 1997; 6: 1829-1834.
101. Gotoh O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. The Journal of biological chemistry 1992; 267: 83-90.
102. Lisurek M,Bernhardt R. Modulation of aldosterone and cortisol synthesis on the molecular level. Molecular and cellular endocrinology 2004; 215: 149-159.
103. 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. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 2010; 95: 779-788.
104. Merke DP, Tajima T, Chhabra A, et al. Novel CYP11B1 mutations in congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11 beta-hydroxylase deficiency. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 1998; 83: 270-273.
105. Bottner B, Denner K, Bernhardt R. Conferring aldosterone synthesis to human CYP11B1 by replacing key amino acid residues with CYP11B2-specific ones. European journal of biochemistry / FEBS 1998; 252: 458-466.
106. Pascoe L, Curnow KM, Slutsker L, et al. Mutations in the human CYP11B2 (aldosterone synthase) gene causing corticosterone methyloxidase II deficiency. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1992; 89: 4996-5000.
107. Zhang G, Rodriguez H, Fardella CE, et al. Mutation T318M in the CYP11B2 gene encoding P450c11AS (aldosterone synthase) causes corticosterone methyl oxidase II deficiency. American journal of human genetics 1995; 57: 1037-1043.
108. Portrat-Doyen S, Tourniaire J, Richard O, et al. Isolated aldosterone synthase deficiency caused by simultaneous E198D and V386A mutations in the CYP11B2 gene. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 1998; 83: 4156-4161.
109. Shojaati K, Causevic M, Kadereit B, et al. Evidence for compromised aldosterone synthase enzyme activity in preeclampsia. Kidney Int 2004; 66: 2322-2328.
110. Marui S, Castro M, Latronico AC, et al. Mutations in the type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B2) gene can cause premature pubarche in girls. Clinical endocrinology 2000; 52: 67-75.
111. Lutfallah C, Wang W, Mason JI, et al. Newly proposed hormonal criteria via genotypic proof for type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 2002; 87: 2611-2622.
112. 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. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 2005; 90: 1287-1293.
113. 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. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 1999; 84: 4410-4425.