



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CİNSİYET ANOMALİSİ OLUP 46,XX KARYOTİPİNE SAHİP
HASTALARDA DAX1 VE WNT4 GEN ANALİZİ**

Ahmet Serhat BAYAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mahmut BALKAN

DİYARBAKIR-2021

TÜRKİYE CUMHURİYETİ



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CİNSİYET ANOMALİSİ OLUP 46,XX KARYOTİPİNE SAHİP HASTALARDA DAX1 VE WNT4 GEN ANALİZİ

Ahmet Serhat BAYAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mahmut BALKAN

DİYARBAKIR-2021



DICLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ahmet Serhat BAYAR'ın hazırladığı “Cinsiyet Anomalisi Olup 46,XX Karyotipine Sahip Hastalarda DAX1 ve WNT4 Gen Analizi” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Mahmut BALKAN _____

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı		_____
Üye		_____
Üye		_____
Üye		_____
Üye		_____

Tarih:/.../202...

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

10/06/2021

Ahmet Serhat BAYAR

İmza

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam esnasında bana her konuda destek olan ve yardımlarını hiç esirgemeyerek yol gösteren, özverili duruşu ile tüm sorunların üstesinden gelmemi sağlayan, fikirleri ile yeni ufuklar kazandıran çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mahmut BALKAN'a

Yüksek Lisans öğrenimim süresince verdikleri dersler ve bilimsel bilgilerini paylaşarak büyük yardım ve desteklerini sunan bölüm hocalarım Sayın Doç. Dr. Selahattin TEKEŞ'e ve Dr. Öğr. Üyesi Diclehan ORAL'a

Bu tezin ortaya çıkmasında büyük katkı sunarak çalışmalarımın tüm aşamalarında güler yüzleriyle hiç sıkılmadan yardımcı olan Arş. Gör. İlyas YÜCEL ve Arş. Gör. Mahir BİNİCİ'ye

Çalışmalarımda her türlü katkıyı esirgemeyen çok değerli anabilim dalı laborant ve çalışanlarına

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda duran ve destek olan aileme ve eşime teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından TIP.19.006 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Ahmet Serhat BAYAR

Diyarbakır - 2021

İÇİNDEKİLER

ONAY.....	I
BEYAN.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
RESİM VE TABLOLAR DİZİNİ.....	VII
KISALTMA VE SİMGELER.....	VIII
1. ÖZET.....	1
1.1. Türkçe Özet.....	1
1.2. Abstract.....	3
2. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
3. GENEL BİLGİLER.....	8
3.1 Normal Cinsel Gelişim.....	8
3.2. Cinsel Gelişim Bozuklukları.....	9
3.3. Bipotansiyel Gonad.....	11
3.4. Cinsiyeti Belirleyen Kromozomların Özellikleri.....	13
3.4.1. Y Kromozomu.....	13
3.4.2. X Kromozomu.....	14
3.5. Karyotip.....	15
3.6. Real-Time PCR.....	15
3.7. DAX1 Geni.....	16
3.8. WNT4 Geni.....	17

4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
4.1. Kromozomların Eldesi.....	19
4.2. Preperatların Boyanması ve Değerlendirilmesi.....	20
4.3. Karyotiplerin Belirlenmesi.....	20
4.4. DNA İzolasyonu.....	21
4.5. Real-Time PCR ile Gen Analizleri.....	22
4.5.1. Kitlerin Rt- PCR Sistem Makinesinde Okunması.....	23
4.5.2. PCR Döngü ve Erime Eğrisi Değerleri.....	23
5. BULGULAR.....	26
5.1. Sitogenetik Sonuçlar.....	26
5.2. Real Time PCR da Gözlenen Gen Mutasyon Analizleri.....	27
5.3. DAX1 Gen Mutasyon Analizi.....	27
5.4. WNT4 Gen Mutasyon Analizi.....	29
6. TARTIŞMA.....	31
7. SONUÇ.....	34
8. KAYNAKLAR.....	35
9. ÖZGEÇMİŞ.....	38
10. EKLER.....	39
10.1. Orijinallik Raporu.....	39
10.2. Etik Kurul Onay Raporu.....	41
10.3. Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Normal Cinsel Farklılaşma.....	8
Şekil 2. Cinsel Gelişim Bozukluklarının Sınıflandırılması.....	11
Şekil 3. Bipotansiyel Gonaddan Over ya da Testis Gelişimi Sırasında Rol Alan Faktörler....	12
Şekil 4. Y Kromozomu ve Üzerindeki Bazı Gen Bölgeleri.....	13
Şekil 5. X Kromozomu ve Üzerindeki Bazı Gen Bölgeleri.....	14
Şekil 6. Normal Dişi Karyotipi.....	20
Şekil 7. PCR Döngü Değerleri.....	24
Şekil 8. Erime Eğrisi Analizi Değerleri (Melt Curve Analysis).....	25
Şekil 9. DAX1 Geni Primer Bağlanma Eğrileri.....	27
Şekil 10. DAX1 Geni Erime Eğrisi.....	27
Şekil 11. WNT4 Geni Primer Bağlanma Eğrileri.....	28
Şekil 12. WNT4 Geni Erime Eğrisi.....	29

RESİM VE TABLOLAR DİZİNİ

Resim 1. PCR Kabini ve Kullanılan Malzemeler.....	23
Tablo 1. PCR Gen Analizinde Kullanılacak Stok İçeriği.....	22
Tablo 2. DAX1 ve WNT4 Genlerinin Primer Dizileri.....	23
Tablo 3. PCR Döngü Değerleri.....	24
Tablo 4. Sitogenetik Sonuçlar ve Yüzdeleri.....	26



SİMGELER VE KISALTMALAR

AMH	: Anti Müllerian Hormon
bp	: Baz çifti
cc	: Santimetre küp
CGB	: Cinsel gelişim bozukluğu
cm	: santimetre
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DAX1	: Dosage-sensitive sex reversal, on chromosome X gene 1
DHT	: Dihidrotestosteron
dk	: Dakika
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
KAH	: Konjenital Adrenal Hiperplazi
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
°C	: Santigrat derece
rpm	: Revolutions per minute: (dakikadaki devir sayısı)
Rt-PCR	: Real-Time Polymerase Chain Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sn	: Saniye
T	: Testosteron

CİNSİYET ANOMALİSİ OLUP 46, XX KARYOTİPİNE SAHİP HASTALARDA DAX1 VE WNT4 GEN ANALİZİ

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Ahmet Serhat BAYAR

Danışmanı: Prof. Dr. Mahmut BALKAN

Ana Bilim Dalı: Dicle Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

1. ÖZET

1.1. Türkçe Özet

Amaç: Bipotansiyel gonaddan over ya da testis gelişimi sırasında rol alan genetik faktörlerden iki tanesi DAX1 ve WNT4 genleridir. Bu genlerdeki değişim ve mutasyonların cinsel gelişim bozukluğuna (CGB) yol açtığı yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Bu çalışmada cinsel gelişim bozukluğu olan hastalarda (46,XX karyotipindeki) DAX1 ve WNT4 genlerinde mutasyon analizi yaparak CGB'na olası etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Genetik Tanı Laboratuvarına CGB ön tanısı ile gelen hastalardan alınan periferik kandan önce kromozom analizi yapıp 46,XX karyotipine sahip bireyler tespit edilmiş, daha sonra 46,XX karyotipine sahip bireylerden elde edilen DNA'lara Real-time PCR (RT-PCR) tekniği uygulanarak DAX1'in exon 1 bölgesindeki 1133A>G (p.Tyr378Cys) mutasyonuna ve WNT4'ün exon 2 bölgesindeki 341C>T (p.Ala114Val) mutasyonuna bakılmıştır.

Bulgular: Araştırılan 61 hastanın 16'sında 46,XX karyotipi tespit edilmiştir. 46,XX karyotipine sahip bu olgulara yapılan RT-PCR sonuçlarında incelenen DAX1 ve WNT4 gen bölgelerinde herhangi bir mutasyon olmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç: Çalışmamızda, cinsel gelişim bozukluğu ön tanısıyla gelen 46,XX karyotipli hastalara yapılan DAX1 ve WNT4 gen analizleri sonucu mutasyon saptanmadığı verisine ulaşılmıştır. Literatürde bildirilen çalışmalarda bu genlerin daha çok dozaja bağlı etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışma gurubumuzdaki CGB'na sahip bireylerde

bu anomaliye neden olan durumların bilinmesi için daha kapsamlı çalışmalar ortaya konulmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Cinsiyet bozuklukları, DAX1, WNT4, Bipotansiyel gonad



GENE ANALYSIS OF DAX1 AND WNT4 IN PATIENTS WITH KARYOTYPE OF 46,XX WITH SEX ABNORMALITY

Student's Surname and Name: Ahmet Serhat BAYAR

Adviser of Thesis: Prof. Dr. Mahmut BALKAN

Department: Institutes of Health Sciences, Medicine Biology, Master Thesis, Diyarbakır, 2020

1.2. ABSTRACT

Aim:

Two of the genetic factors involved in the development of the ovary or testis from the bipotential gonad are the DAX1 and WNT4 genes. It has been determined by studies that changes and mutations in these genes cause sexual development disorder (DSD). . In this study, it was aimed to evaluate the possible effects of DAX1 and WNT4 genes in patients with sexual development disorders (46,XX karyotype) by performing mutation analysis.

Material and Method: In this study, chromosomal analysis was performed before peripheral blood taken from patients who came to Dicle University Medical Faculty Hospitals Medical Biology Department Genetic Diagnosis Laboratory with the preliminary diagnosis of CGB, and individuals with 46,XX karyotype were determined. By applying the -time PCR (RT-PCR) technique, the 1133A>G (p.Tyr378Cys) mutation in the exon 1 region of DAX1 and the 341C>T (p.Ala114Val) mutation in the exon 2 region of WNT4 were examined.

Results: 46,XX karyotype was detected in 16 of 61 patients investigated. In the RT-PCR results of these cases with 46,XX karyotype, it was determined that there was no mutation in the DAX1 and WNT4 gene regions examined.

Conclusion:

In our study, it was found that no mutation was detected as a result of DAX1 and WNT4 gene analyzes performed on patients with 46,XX karyotype who presented with a pre-

diagnosis of sexual development disorder. In studies reported in the literature, it has been determined that these genes show more dosage-related effects. For this reason, more comprehensive studies should be conducted to know the conditions that cause this anomaly in individuals with DSD in our study group.

Key Words: Gender disorders, DAX1, WNT4, Bipotential gonad



2. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan vücut hücreleri 23 çiftten oluşan 46 kromozoma sahiptir. Bunların 22 si erkek ve dişide aynıdır ve otozomlar olarak isimlendirilmektedir. Kalan çift ise cinsiyet kromozomlarını (gonozomlar) oluşturur ve genellikle dişilerde XX, erkeklerde ise XY olarak bulunmaktadır. Kromozomlar hücrelerin çekirdeğinde bulunan ve genetik bilgiyi (genler) taşıyan yapılardır. Hücredeki kromozomlar özdeş çift kromozomlar halinde eşlendikten sonra belli bir düzene göre sıralanır ve o kişinin karyotipini meydana getirir. Her bireyin kromozom sayısı, büyüklüğü ve şekli onun karyotipini ifade eder. Karyotip Analizi hücrelerde ki kromozomların sayılarını ve yapılarını inceleyerek bunlarda herhangi bir bozukluk veya hastalık sebebi olan genetik sorunları tanımlamaya yarayan laboratuvar testidir. Karyotip analizinde incelenen insan kromozom grupları A'dan G'ye şeklinde 7 gruba ayrılır. Dişi ve erkek olduğunu gösteren cinsiyet kromozomları ise X, Y olarak tanımlanır. Normal karyotip kadında 46 XX, erkekte ise 46 XY' dir (1).

İnsan kromozomları ilk kez 1857 yılında Virchow tarafından görüldü, kromozom sözcüğü ise 1988 yılında Waldeyer tarafından kullanıldı. Tjio ve Levan 1956 yılında, insan fetal akciğer fibroblastları ile yaptıkları kültürlerden elde ettikleri hücrelerde insan kromozomlarının sayısının 46 olduğunu ve cinsiyet kuruluşunun XX ve XY olduğunu kesin olarak saptadı (2).

Cinsiyet gelişimi bir tür içinde genetik çeşitliliğin sürekli üretimi için sağlam bir mekanizma sağlayan gelişimin kritik bir evresidir. Cinsiyet gelişim bozuklukları karyotipe göre cinsiyet kromozomlarına bağlı CGB, 46,XY CGB ve 46,XX CGB şeklinde sınıflandırılabilir. Bir embriyonun cinsiyet tespitini etkileyen ana faktör, Y kromozomunun varlığı veya yokluğu ile belirlenen genetik cinsiyettir. Y kromozomunun varlığı, bipotansiyel gonadı, testise özgü farklılaşmaya ve erkeğe özgü bir gonad oluşumuna doğru yönlendirirken, Y kromozomunun yokluğu dişiye özgü gonad olan yumurtalık gelişimiyle sonuçlanır. Bununla birlikte, bazı bireyler Y kromozomu taşır, ancak fenotipik olarak dişidir veya dişi bir karyotip vardır ancak fenotipik olarak erkektir.

Cinsiyet gelişim bozuklukları kromozomal, gonadal veya anatomik cinsiyet gelişiminin atipik olduğu konjenital durumlar olarak tanımlanır. Belirsiz genital organla, androjen duyarsızlığı ve genetik cinsiyete zıt gonadal ile dış cinsiyet de dahil olmak üzere

bir dizi fenotipi kapsar. Cinsel gelişim, hem bipotent öncülü gonadların belirlenmesini hem de cinsiyet hormonlarından kaynaklanan üreme organlarının farklılaşmasını içerir. Cinsel gelişim bozukluğu vakalarının çoğunluğu açıklanamamaktadır. Bu da, cinsiyet gelişimi yollarının önemli bileşenlerinin henüz keşfedilmediğini kuvvetle ortaya koymaktadır (3).

Cinsiyet gelişim bozukluğu; gonadal gelişimin belirlenmesinden sorumlu yoldaki varyantlardan veya hormon üretimindeki ve duyarlılığındaki kusurlardan dolayı cinsiyet farklılaşmasının bozulmasından kaynaklanır (4).

Cinsiyet gelişimi iki farklı ve sıralı aşamada gerçekleşir. Cinsiyet belirleme ve cinsiyet farklılaşması. Memelilerde cinsiyetin belirlenmesi, bipotansiyel gonadın, testis veya yumurtalık olarak farklılaşmasını teşvik eden gelişimsel bir değişime neden olduğu benzersiz bir süreçtir. İnsan gelişimi sırasında bu karmaşık genetik sürecin kesintileri, cinsel gelişim bozuklukları olarak ortaya çıkabilir (5).

Cinsiyet gelişim bozuklukları, sıkı düzenlenmiş süreç kesintiye uğradığında ortaya çıkar, bu da öncelikle testislerin veya yumurtalıkların gelişimine müdahale eden genetik mutasyonların veya ekstragonadal dokulardaki endokrin ve yerel faktörlerin eylemlerinin sonucu olarak ortaya çıkar (6).

Cinsiyet belirlemede yer alan genlerin tanımlanması, Y kromozomuna bağlı bir gen olan testis belirleyici gen SRY'nin keşfi ve karakterizasyonu ile teşvik edildi. İnsanlarda SRY seviyeleri gebe kaldıktan yedi hafta sonra ürogenital sırtta yukarı regüle edilir ve 46, XY bireyde bipotansiyel gonadı testis oluşumuna yönlendirir (7).

SRY'nin insan erkek cinsiyet belirlemede başlatıcı faktör olduğuna dair kanıtlar, SRY'nin DNA bağlanma bölgesini bozan mutasyonların ve silinmelerin keşfiyle başladı (8).

Erkek cinsiyet belirleme sürecinde, Y kromozomunda yer alan SRY'nin ekspresyonu, Sertoli hücreleri içinde nihai olarak testisin morfolojik farklılaşmasını sağlayan bir gen ekspresyonu zincirini başlatır. Cinsiyet farklılaşmasında, testosteron, dihidrotestosteron ve Anti-Müllerian hormonu gibi endokrin ve lokal faktörlerin testis tarafından salgılanması, erkek iç ve dış genital organların gelişmesine ve kadın iç genital yapılarının öncülleri olan Müllerian kanallarının karşılıklı gerilemesine neden olur (5).

Erkek cinsiyet belirlemede yer alan ikinci ana gen, SRY ile ilgili transkripsiyon faktörü SOX9'u kodlayan gendir. İnsanlarda SOX9'daki mutasyonlar 46,XY belirsiz cinsel organlardan dişi fenotipe kadar değişen dış genital bölgelere neden olur (13).

46,XX karyotipli bireylerde yumurtalık gelişimi anomalisi, iki farklı durumdan birine neden olabilir: gonadal disgenez veya 46,XX testis dokusunun varlığı. 46,XX ve 46,XY gonadal disgenezi arasındaki temel fark, iç ve dış genital bölgelerin fenotipinin, cinsiyet kromozomlarının tamamlayıcısı ile uyumlu olmasıdır. Bunun tersine, 46,XY karyotipli bireylerde, hipospadiastan dişi fenotipe kadar değişebilen ve belirsiz cinsel organları içerebilen dış cinsel organlarda bir dereceye kadar fenotipik değişkenlik vardır (17).

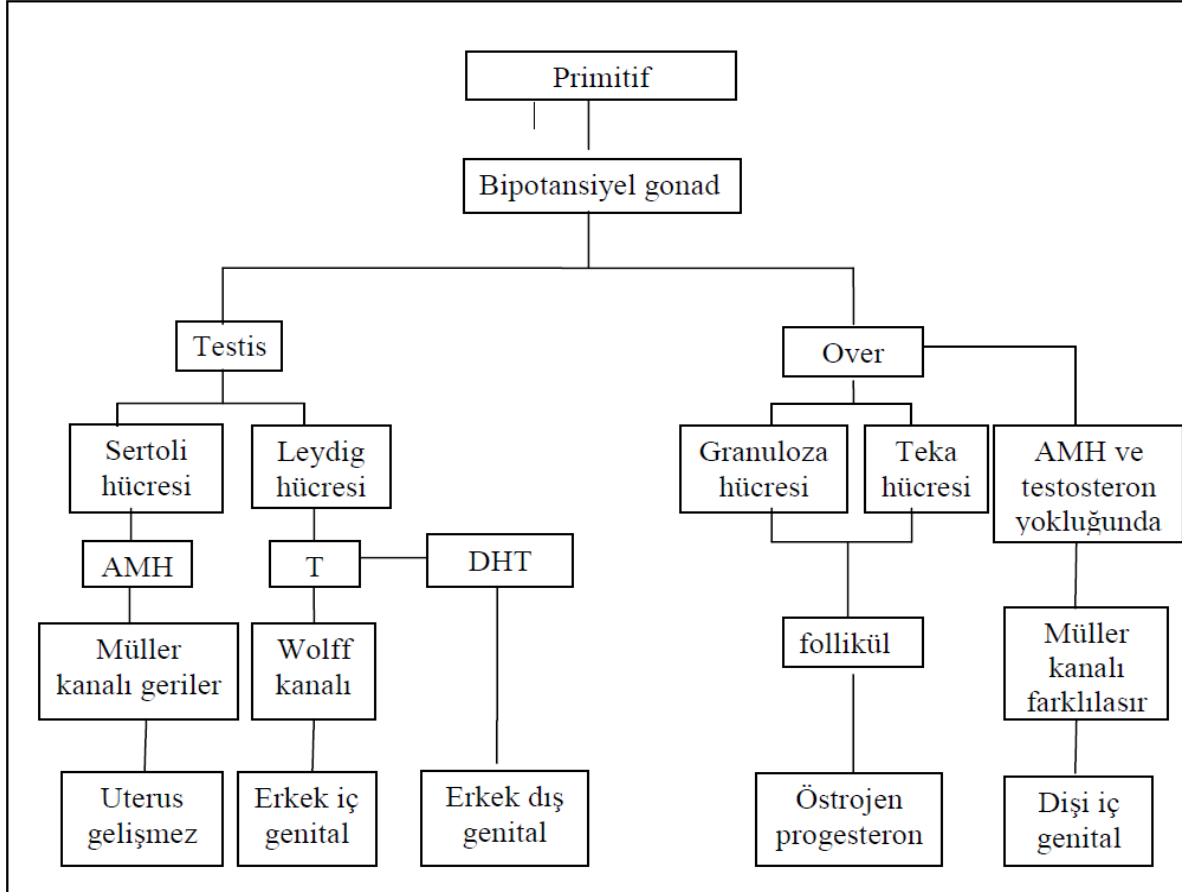
46,XX cinsel gelişim bozuklukları kendi içinde over gelişim bozuklukları, androjen fazlalığı ve bazı sendromlar ya da genetik anomaliler olarak gruplandırılmıştır. Over gelişim bozukluklarında gonadal disgeneziler, Ovotestiküler CGB, testiküler CGB yer almaktadır. 46,XX CGB kuşkulu genital yapının en sık nedeni cinsiyet steroid biyosentezindeki enzim eksikleri ve eksik olan enzim basamağının gerisindeki öncül hormonların, özellikle de androjen öncüllerinin artmasıdır (43).

Çalışmamız cinsel gelişim bozukluğu ön tanısı ile gelen ve cinsel gelişimin farklı klinik özelliklerine sahip 61 olgunun Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Genetik Tanı Laboratuvarında incelenmiş ve 46,XX karyotipine sahip bireylerin DAX1'in exon 1 bölgesindeki 1133A>G (p.Tyr378Cys) mutasyonunu ve WNT4'ün exon 2 bölgesindeki 341C>T (p.Ala114Val) mutasyonunun analizleri yapılarak cinsel gelişim bozukluğu üzerindeki etkilerini literatür eşliğinde değerlendirerek analiz etmeyi amaçladık. Çalışmamızda saptanan anomalilerin çoğu literatür verileri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

3. GENEL BİLGİLER

3.1 Normal Cinsel Gelişim

Döllenmeyle başlayan cinsel oluşum belli bir sırayı izler. Bu basamaklar oldukça karmaşık bir düzen içerisinde devam eder ve cinsel gelişimin başlangıcından sonuna kadar hata olmaksızın sürmesi gerekir. Primitif germ hücresinin gelişerek cinsiyeti belirlemesi süreci ile başlayan ve dişi veya erkek olması ile son bulan süreçte tüm basamakların eksiksiz bir şekilde devam etmesi gerekir ki cinsel kimlik belirlenebilsin. Hem bipotansiyel gonad öncesi hem de sonrası süreçte cinsiyeti belirleyen gen, hormon ve proteinlerde meydana gelebilecek bir aksaklıkta cinsel gelişim bozukluğu meydana gelir. Şekil’1 de normal cinsel gelişimi şematik olarak gösteren basit bir yapı gösterilmiştir.



Şekil 1. Normal Cinsel Farklılaşma (12)

3.2. Cinsel Gelişim Bozuklukları

Bir bireyin cinsiyeti nasıl belirlenir? Embriyoloji ve gelişim biyolojisinde uzun zamandır devam eden bir soru olmuştur. Cinsiyet tayininde rol oynayan genetik ve moleküler mekanizmalar oldukça değişkendir. Son yıllarda yapılan, cinsiyet belirleme ve cinsel farklılaşma çalışmaları, omurgalılarda cinsiyetin genotiplere veya çevresel sinyallere dayanan geniş çeşitlilikte ki mekanizmalar tarafından düzenlendiğini ortaya koyulmuştur (19).

Normal cinsiyet gelişiminde kromozomlar önemlidir. Dişi fenotip için kromozom yapılanmasının 46,XX olması, bunun yanında normal over gelişimi için bazı genetik faktörlerin (DAX1 veya WNT4 gibi sinyal moleküllerinin) bulunması gereklidir. Erkek fenotip yapılanmasının 46,XY olması, gelişimi için Y kromozomunun varlığı ve bu kromozom üzerindeki SRY gen bölgesinin bulunması şarttır.

Cinsel gelişim bozukluğu; dış genital yapı ile gonad morfolojisi arasındaki uyumsuzluk anlamına gelmektedir. Normal cinsel gelişim üç aşamada gerçekleşir. İlk olarak genetik cinsiyetin belirlenmesi, bu da döllenmeyle birlikte cinsiyet kromozomlarının eşleşmesiyle oluşur. İkinci faz farklılaşmamış gonadın testis veya ovaryuma dönüşümü. Üçüncü faz ise cinsel fenotipin belirlenmesidir (12).

Memeli embriyonik gelişiminin erken evrelerinde, embriyolar cinsel olarak farklılaşmamıştır. Farklılaşmamış gonadlar, ara mezodermden türetilir ve mezonefrosun ventromedial yüzeyi üzerindeki sölomik epitelinin eşleştirilmiş kalınlıkları olarak ortaya çıkar. Testis veya over gelişimi yolağındaki genlerin herhangi birinin bozulması, cinsel gelişim bozukluklarına sahip bireylerle sonuçlanabilir (18).

Fisher, tüm erkeksi özelliklerin Y kromozomu üzerindeki genlerin kontrolünde olmasının şart olmadığına işaret etmiştir. Çünkü Y ile bağlantılı sadece tek bir gen gonadı erkek yönde farklılaştırmaktadır. Sonrasında testiküler hormonlar, otozomal bütündeki genler tarafından kontrol edilmektedir. Bu strateji içerisinde herhangi bir gen cinsel dimorfizmin oluşmasına katkıda bulunabilir (12).

Yakın zamanda dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ve genomik sıralamanın sağlam yeni teknolojilerinin ortaya çıkmasıyla birlikte, yeni cinsiyet belirleyici genler tespit edildi. Bu genler, bir başkasının aktivitesini engelleyebilen yumurtalık ve testis belirleyici

yollar şeklinde düzenlenmiştir. Bu koşullar, yaşam döngüsünün farklı zamanlarında, belirsiz dış cinsel organları olan fetüslerde veya yeni doğanlarda, disgenetik gonadlarda ve kromozom yapısı için uyuşmayan iç cinsel organlarda tanımlanabilir. 46,XY bireyde DAX1 ve WNT4 genlerinin duplikasyonu gonadal disgeneze yol açabilirken, SOX9 veya SOX3 genlerinin duplikasyonu 46,XX testiküler cinsel gelişim bozukluğuna yol açabilir. Y kromozomu üzerindeki bir genin ekspresyonu, farklılaşmamış gonadın testis olarak gelişmesine neden olan genetik bir kaskad başlatır. Testisteki Leydig hücrelerince salgılanan testesteron, Wolffian kanallarının seminal veziküller, vazdeferens ve epididim olarak farklılaşmasına ve Sertoli hücrelerince salgılanan AMH, Mullerian kanallarının gerilemesine neden olur. Bir Y kromozomu ve bu genin ekspresyonunun yokluğunda testis gelişmez, Wolffian kanalları geriler ve Mullerian kanalları fallop tüpleri, uterus ve vajinanın üst üçte birlik kısmı olarak gelişir. Gonadal gelişimin genetik yolu hatalıysa, gen fonksiyonları kaybolur veya geçersiz kılınırsa, cinsel gelişim bozukluğu ortaya çıkar. Genital fenotipin çok geniş bir yayılım göstermesi ve birçok vakada genotip-fenotip ilişkisinin zayıf olması nedeni ile patolojileri net sınırlar ile ayırmak zordur (20).

46,XX ile ilişkili testis veya ovotestiküler CGB'ler nadirdir ve esas olarak fetal bipotansiyel gonad içindeki majör testis belirleme geni SRY ile ilişkili SOX ailesi genlerinin olması gereken yerde değil de başka bir yerde ekspresyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkar. Gen izolasyonu yapılmış 46,XX testiküler CGB'lerin % 90'ına kadarı, SRY'nin X kromozomuna veya bir otozomal kromozoma translokasyonunu içerdiği tespit edilmiştir (21).

Memelilerde cinsiyet tayini, gelişim zamanına ve gen ekspresyonuna bağlı genetik olarak kontrol edilir. Spesifik olarak, erkek cinsiyeti belirleyen genlerin FGF9, SOX9, DMRT1 ve dişi cinsiyeti belirleyici genlerin DAX1 (NR0B1), FOXL2, RSPO1 ve WNT4 olduğu yapılan çalışmalar göstermiştir (19).

Cinsel gelişim bozukluğunun nedenlerinin erken dönemde tespit edilmesi, etkilenen olguların erken dönemde cinsel kimliğinin belirlenmesi ve tedaviye yönlendirilmesi açısından oldukça önemlidir (20).

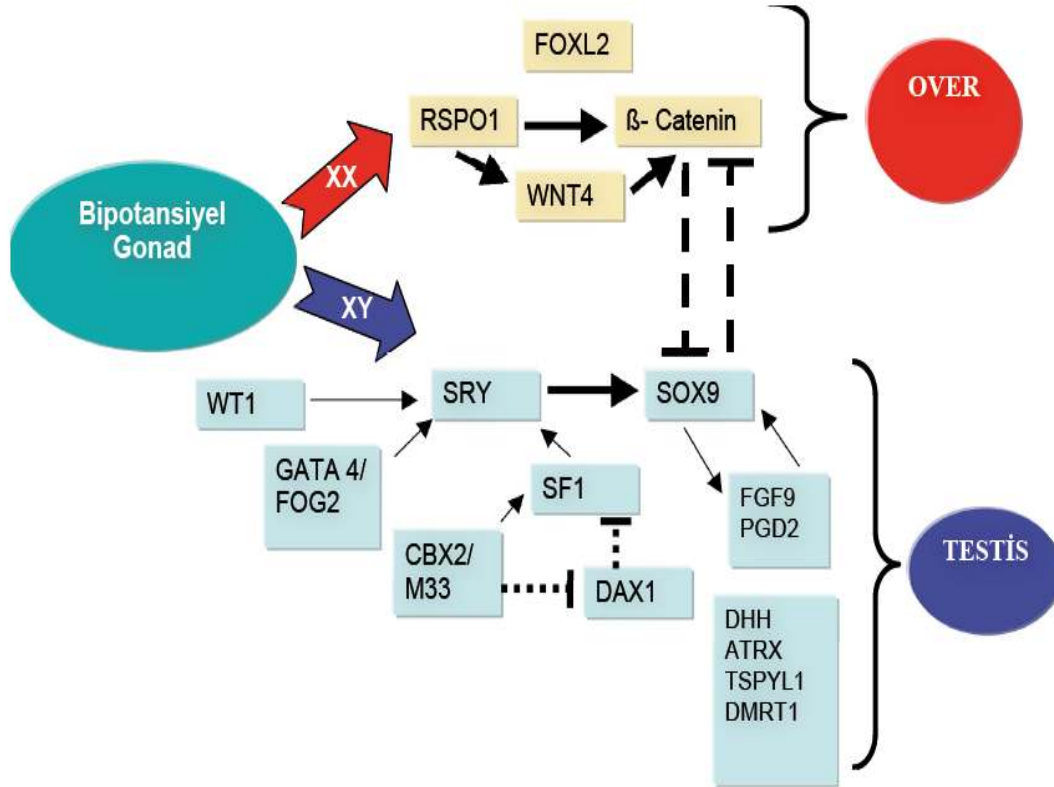
Seks kromozomuna bağlı CGB	46,XY CGB	46, XX CGB
45,X (Turner sendromu ve varyantları)	Gonad gelişim bozuklukları: (1) Tam gonadal disgenezi (2) Kısmi gonadal disgenezi (3) Gonadal regresyon sendromu (4) Ovotestiküler CGB	Gonad gelişim bozuklukları: (1) Ovotestiküler CGB (2) Testiküler CGB (SRY+,SOX9 duplikasyonu) (3) Gonadal disgenezi
47, XXY (Klinefelter sendromu ve varyantları)	Androjen sentez veya fonksiyon bozuklukları: (1) Androjen sentez bozuklukları (örneğin StAR mutasyonu, 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz eksikliği, 5 α -redüktaz eks.) (2) Androjen fonksiyon bozukluğu (Tam-kısmi androjen duyarsızlık sendromları) (3) LH reseptör kusurları (leydig hücre aplazisi-hipoplazisi) (4) MIF sentez ve reseptör bozukluğu (Persistan Müller kanal sendromu)	Androjen fazlalığı: (1) Fetal kaynaklı (21-hidroksilaz ve 11-hidroksilaz eksiklikleri) (2) Fetoplasental (Aromataz eksikliği) (3) Maternal (Luteoma,vs)
45,X/46,XY (Miks gonadal disgenezi, ovotestiküler CGB)		Diğerleri (kloaka ekstrofisi,vajinal atrezi)
46,XX/46,XY (Kimerik, ovotestiküler CGB)		

Şekil 2: Cinsel gelişim bozukluklarının sınıflandırılması (12)

3.3. Bipotansiyel Gonad

İnsanlarda embriyonik yaşamın 6. haftasına kadar gonadlarda cinsel farklılık gözlenmez. XX veya XY bireylerin farklılaşmamış gonadları bu haftaya kadar görünüşte aynıdır ve sonrasında yumurtalık veya testis oluşturabilir. Bu nedenle bu döneme gonadal gelişimin kayıtsız kaldığı veya bipotansiyel gonad aşaması denir. Gonadlar daha sonra ekstra gonadal kökenli primordial germ hücreleri tarafından kolonize edilir (15).

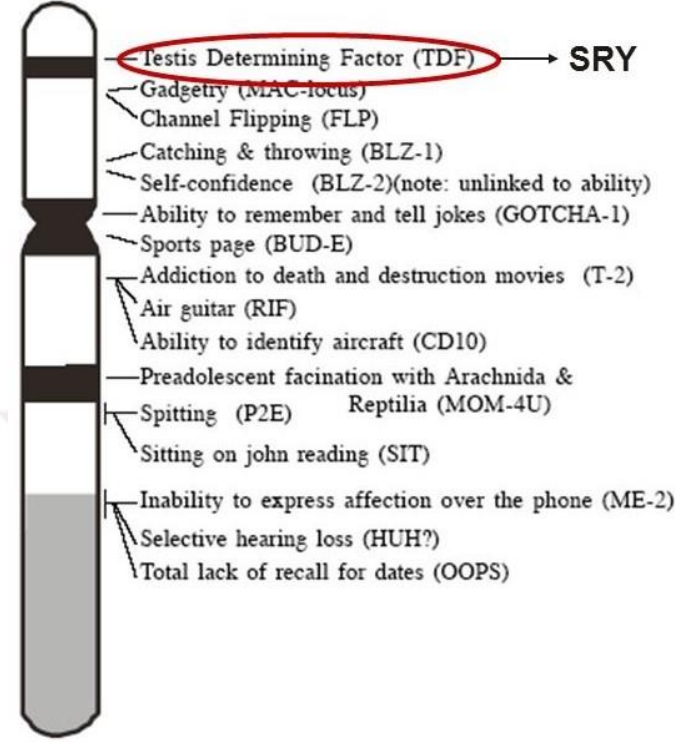
Döllenmeyle oluşan genetik cinsiyet, bipotansiyel gonadın yumurtalık veya testis olarak gelişip gelişmediğini belirler. Yumurtalığa özgü faktörler, dişi kaderine yönelik gonadal farklılaşmayı kontrol ederken, testis faktörleri spesifik olarak bastırılır. Yine aynı şekilde testise özgü faktörler oluşurken yumurtalık faktörleri baskılanır (16).



Şekil 3: Bipotansiyel gonaddan over ya da testis gelişimi sırasında rol alan faktörler

3.4. Cinsiyeti Belirleyen Kromozomların Özellikleri

3.4.1. Y Kromozomu



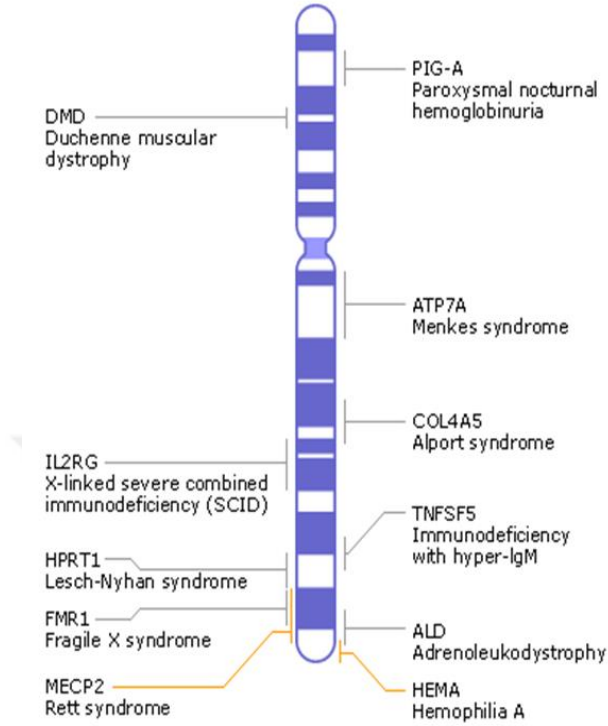
Şekil 4: Y Kromozomu ve üzerindeki bazı gen bölgeleri

Toplam gen sayısı yaklaşık olarak 60 tır.

59 milyon nükleotit çifti içerir. (tüm genomun %2'si)

Y kromozomu en özelleşmiş kromozomlardan bir tanesidir. Var olup olmamasıyla cinsiyetin belirlenmesinde en baştaki rolü üstlenir. Bu kromozom üzerindeki SRY geninin varlığı ve etkisi, erkek gonadal farklılaşmasını ve erkek fenotipinin gelişimini yönlendirir. SRY geninin varlığına rağmen XY bireylerinde erkek gelişimini baskılayabilen doza duyarlı X kromozomu veya otozomal kromozomlardaki genlerden etkilenebilir (9).

3.4.2. X Kromozomu



Şekil 5: X Kromozomu ve Üzerindeki Bazı Gen Bölgeleri

Üzerinde yaklaşık olarak 900 tanımlanmış gen bulunur.

155 milyon nükleotit çiftinden oluşur (tüm genomun %5'i).

Y kromozomunun tersine X kromozomu vücuttaki her sistemin işleyişiyle ilgilidir ve 280'den fazla belirlenmiş genetik bölge içermektedir. Bu bölgeler hem erkek hem de dişilerin cinsel farklılaşmasında önemli rol oynayan genleri içermektedir. Erkeklerde genital farklılaşma ve sekonder seksüel karakterlerde önemli yeri olan androjen reseptör geni X kromozomunda bulunmaktadır (8).

Yine X kromozomu kollarındaki bazı segmentlerindeki genlerin Klinefelter ve Turner gibi bazı sendromların kaynağını teşkil ettiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. X kromozomunun uzun kolu üzerindeki kritik bölgelerde kırılma ya da yapısal anomalileri olan bireyler gonadal disgenezi, primer ve sekonder amenore, infertilite gibi rahatsızlıkların ortaya çıktığı tespit edilmiştir (14).

3.5. Karyotip

Bir hücredeki kromozomların özdeş çift kromozomlar halinde eşlendikten sonra, belli bir düzene göre sıralanmasıdır. Her bireyin kromozom sayısı, büyüklüğü ve şekli onun karyotipini ortaya koyar. Karyotip analizlerinde kromozomlar sayısal, yapısal ve büyüklük olarak incelenir. Yani karyotip tek bir hücrenin boyutlarına göre sıralanmış ve dizilmiş metafaz kromozomlarını gösterir.

Bir türe ait karyotipin hazırlanmasıyla, türün diploid sayısı, kromozomlarının morfolojileri, eşey kromozom sistemlerinin belirlenmesi, nükleolar organize edici bölgelerin konumu hakkında genel bilgilere ulaşılmış olur (13).

İnsan genomunu oluşturan kromozomlar, özel boyama tekniklerinin kullanılmasıyla belirginleşen boyut ve bant deseni gibi özelliklere göre sıralanmaktadır. Karyotipin temel yararı, bir türün kromozomlarının her birinin özelliklerinin ayrıntılı olarak incelenmesini sağlamaktır. Karyotipler, Uluslararası İnsan Sitogenetik İsimlendirme Sistemi (ISCN) tarafından onaylanan gösterime göre tanımlanır. Bu sistemde, her bir kromozoma verilen sayı, boyutuyla ilgilidir ve genellikle büyükten küçüğe doğru sıralanır. Karyotipi elde etmek için sitogenetik analizler genellikle oral mukoza ya da lenfosit kültürü kullanılarak gerçekleştirilir. Yeni doğanlarda yapılan çalışmalarda amniyotik sıvıdan ya da fetal kan hücrelerinden örnekler alınır (32).

Karyotip belli bazı özel metodlarla elde edilir.

3.6. Real-Time PCR

Real-time PCR metodu ile çok az miktardaki biyolojik bir örneğin özelliğini hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde ortaya koyabilmektedir. Real-time PCR teknolojinin; patojenlerin tespiti, onkolojik çalışmalar, genetiği değiştirilmiş organizmalar, doğum öncesi (Prenatal) tanı çalışmaları gibi uygulama alanları vardır.

3.7. DAX1 Geni

Seks reversal genlerden biri olan (NR0B1) DAX1 geni, X kromozomunun p21.3 -21.2 lokusunda bulunmakta, cinsiyet belirlemede ve özellikle over gelişimi üzerinde işlevi olan nükleer bir reseptördür (22).

DAX1 iki exondan oluşur. Bir exon 1168 bp'den, diğeri 245 bp'den olmak üzere toplam 1413bp'den oluşur. Her iki exon da 3385 bp'lik bir intron ile ayrılır. DAX1, 470 amino asit uzunluğunda bir proteini kodlar (41).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, yumurtalık gelişimini aktif olarak destekleyen ve erkek cinsiyet gelişimini baskılayan gen olarak tanımlanmıştır (3).

DAX1, erken gonadal cinsiyet tespitinde kritik bir role sahiptir. SRY ekspresyonu durduktan sonra, DAX1 gelişmekte olan testiste azalır, ancak overde ekspresyon seviyelerini korur. DAX1'in bir yumurtalık belirleyici gen olmadığını, ancak eğer over eksprese edilirse, bir anti-testis geni olarak SRY'ye antagonistik olarak davrandığını düşündüren fonksiyonel yumurtalıklar geliştirir. DAX1 geninin fonksiyon kaybı, mutasyonları, duplikasyonu veya silinmeleri, cinsiyet gelişim bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir. 46,XY bireylerde DAX1 yeterli bir dozajda mevcutsa, normal testis gelişimini indükleyebilir. Öte yandan, çok az veya çok fazla DAX1 aktivitesi yanlış düzenlenmiş testis gelişimine yol açar. Aşırı ekspresyonu, testis vaskülatürünün bozulmasına ve leydig hücre gelişimini baskılayarak testosteron üretiminin inhibe edilmesine neden olur, ancak cinsiyet tersine çevrilmeye yol açmaz (18).

DAX1'in fonksiyon kaybı mutasyonları veya silinmeleri, konjenital adrenal hipoplaziye ve azalmış steroidogenez nedeniyle erkek genital gelişimindeki anormalliklerle ilişkili hayatı tehdit eden adrenal yetmezliğe yol açar (24).

DAX1 geni duplikasyonunun, 46,XY'li bireylerde gonadal disgeneziye neden olduğu bildirilmektedir. Öte yandan bu gende işlev kaybına neden olan mutasyonların varlığı erkekleşme yönündeki genler üzerindeki antagonist etkiyi yok edeceğinden XX bireylerde testis gelişimine neden olabilir (25).

DAX1, adrenal korteks, gonadlar, hipotalamus ve hipofizde ifade edilir. DAX1'deki mutasyonlar, insanda primer adrenal yetmezliğe ve hipogonadotropik hipogonadizme (HH) yol açar (30).

3.8. WNT4 Geni

WNT4 geni, 1. kromozomun p35 lokusunda bulunan 5 exon, 4 intron bölgesinden oluşan bir gendir. Exon bölgeleri toplam 1654 bp meydana gelir. Bu gen, erkek cinsiyet farklılaşmasını baskılayan, cinsiyet gelişiminde ve prenatal gelişimde kritik rol oynayan WNT gen ailesinin bir üyesidir (42).

WNT genleri, vücuttaki kimyasal sinyal yollarına katılan proteinlerin yapımına etki eder. Bu yollar belirli genlerin aktivitesini kontrol eder ve embriyonik gelişim sırasında hücreler arasındaki etkileşimi düzenleyerek, dişi üreme sistemi, böbrekleri ve birkaç hormon üreten bezin oluşumu için önemli olan proteinlerin üretilmesini sağlar. Dişi üreme sisteminin gelişimi sırasında, WNT4 proteini embriyoda uterus, fallop tüpleri, serviks ve vajinanın üst kısmına gelişen yapılar olan Müllerian kanallarının oluşumunu düzenler. Bu protein ayrıca postnatal dönemden yetişkinliğe kadar yumurtalıkların gelişmesinde rol oynar ve yumurtalıklardaki yumurta hücrelerinin (oositlerin) gelişimi ve bakımı için önemlidir. Ek olarak, WNT4 proteini erkek cinsiyet hormonlarının (androjenlerin) üretimini düzenler.

WNT4 genindeki mutasyonun, dişilerdeki üreme sistemini etkileyen bir durum olan Müllerian aplazi ve hiperandrojenizme neden olduğu bulunmuştur. Bu duruma sahip bireyler tipik olarak azgelişmiş veya eksik bir uterusu sahiptir ve adet görmezler. Ayrıca, akne ve aşırı yüz kıllarına neden olabilecek anormal derecede yüksek androjen seviyelerine sahip olabilirler (31).

Salgılanan sinyal molekülleri ailesinin üyesi olan WNT4, yapılan bir çalışmada tespit edilen ilk dişi cinsel gelişim geni olduğu ve cinsiyet belirleme faktörlerinden biri olduğu bildirilmiştir. WNT4'ün gelişmekte olan XX fare bireylerin yumurtalığında eksprese olduğu, ancak gelişmekte olan testiste down regüle edildiği tespit edilmiştir. WNT4'ü delesyona uğramış farelerde, XX bireylerin erkekleştiğini, bu da bu genin kadın cinsel gelişimi için gerekli olduğunu gösterir (3).

Yapılan başka bir çalışmada WNT4'ün, gelişmekte olan yumurtalıkta kalıcı iken testis gelişimi başladıktan sonra erkek gonadlarda baskılandığı bildirilmiştir. WNT4 geninde homozigot mutasyona sahip XX farelerde, iç genital organların ve yumurtalıkların gelişiminin ciddi bir şekilde bozulduğu, yumurtalık kortekslerinde hızlı apoptoz gerçekleştiği tespit edilmiştir. İnsan fetal yumurtalıklarında WNT4 proteininin ekspresyonu,

yeni foliküllerin hızla oluştuğu hamileliğin ortasında yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum WNT4'ün, uygun folikül yapılarına sahip olmayan WNT4'ten yoksun hayvanlarda da gösterildiği gibi, insan yumurtalıklarında folikül oluşumunun düzenlenmesinde önemli bir role sahip olabileceği anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, WNT4'ün fetal yaşamın ilerleyen dönemlerinde yumurtalıklarda ve yetişkin bireylerin yumurtalıklarında da mevcuttu ve WNT4'ün insan yumurtalıklarında foliküler gelişim ve olgunlaşmada rol oynayabileceği görüşünü desteklemektedir. Ayrıca WNT4'ün insan yumurtalıklarında oosit sağ kalımı, folikül oluşumu ve folikül olgunlaşmasının düzenlenmesinde rol oynayabileceği görüşünü desteklemektedir (26).

Günümüzde WNT4 mutasyonları 46,XX CGB hastalarında tanımlanmış ve dişi gelişimindeki temel rolü doğrulamıştır. WNT4 mutasyonlarında Müller yapıların gelişiminin bozulduğu, bununla beraber Wolf kanal yapılarında herhangi bir anomali izlenmediği tespit edilmiştir (27).

Sonuç olarak WNT4, erkek cinsel farklılaşmasını baskılayarak, Müllerian kanal farklılaşmasını teşvik edip cinsel farklılaşmada rol oynadığı ve oosit sağlığını koruduğu bulunmuştur (28).

Heterozigot WNT4 mutasyonu taşıyan kadın hastalarda, müllerian kanal anormallikleri ile birlikte hiperandrojenizm de bulunduğu tespit edilmiştir (29).

WNT4 geni DAX1 i arttırarak SF1'i antagonize eder ve bu şekilde testis gelişimini engeller. Aynı zamanda RSPO1 ve WNT4 birlikte β -katenini stabilize ederek dişi yönde cinsiyet gelişimini uyarırken testis gelişimini baskılar (43).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Genetik Tanı Laboratuvarına 2018-2020 yılları arasında cinsel gelişim bozukluğu ön tanısı ile gelen hastalardan alınan periferik kandan önce kromozom analizi yapıp 46,XX karyotipine sahip bireyler tespit edilmiş daha sonra bu bireylerin DNA'ları izole edilerek mutasyon analizi yapılmıştır. Hasta bireylerden elde edilen DNA'lar ile sağlıklı erkek ve dişi kontrol grubu kullanılarak DAX1 ve WNT4 gen mutasyonu tespit etmek için, Real-time PCR tekniği uygulanarak genlerde mutasyon analizleri yapılmıştır.

4.1. Kromozomların Eldesi

Kromozomlar lenfosit kültürü yöntemi ile elde edilmiştir. Lenfosit kültür yöntemi ile kromozomları elde etme yöntemi aşağıdaki gibidir:

1. Hastadan heparinli steril enjektör yardımı ile 4-5 ml kan alınır. Hastanın adı soyadı tüpe yazılır.
2. Kültür besi yerinden falkon tüplere 5 ml bırakıldı.
3. Hastadan alınan kan 5-6 damla tüplere eklendi ve 72 saatlik inkübasyon için etüve bırakıldı.
4. 72 saatin son 45 dakikasında etüvden çıkarılan tüpe 2 damla colcemid eklendi ve tekrar etüve bırakılarak 72 saatin sonunda çıkarıldı.
5. Etüvden çıkarılan tüpler biraz vortekslelendikten sonra 1200 rpm de 10 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası üstteki süpernatant atıldı, altta kalan pelet vortekslenip üzerine 10 ml hipotonik solüsyonu eklendi ve 10 dakika etüve bırakıldı.
7. 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra tekrar üstündeki süpernatant atıldı ve vortekslenirken üstüne pastör pipetle 10 ml fiksatif eklendi.
8. Birkaç defa fiksatif ile yıkama işlemi tekrarlandı.
9. Son yapılan santrifüjden sonra tüplerin içinde 0.5-1 cc pelet bırakıldı.
10. Alt kısımdaki pelet pipet ile karıştırılıp lamlara 25-30 cm yükseklikten damla damla damlatılarak yayıldı.
11. Kuruması için bekletilen preparat 3 gün etüvde yaşlanmaya bırakıldı.
12. Üçüncü günün sonunda preperatlar, içerisinde pankreatin çözeltisi bulunan şalelere 30-60 saniye bekletilip çıkarıldı.

13. Oradan çıkarılan preparatlar iki defa içerisinde destile su bulunan şalelere batırılıp çıkarıldı.
14. Daha sonra Giemsa boyasının bulunduğu şalelere bırakılan preparatlar 4-5 dk boyamaya bırakıldı.
15. Boyadan çıkarılan preparatlar iki defa distile suya batırılıp çıkartıldı.
16. Temizlenen preparatlar kromozom analizi yapıp karyotip oluşturmak için mikroskop altında incelenmeye hazır hale getirildi.

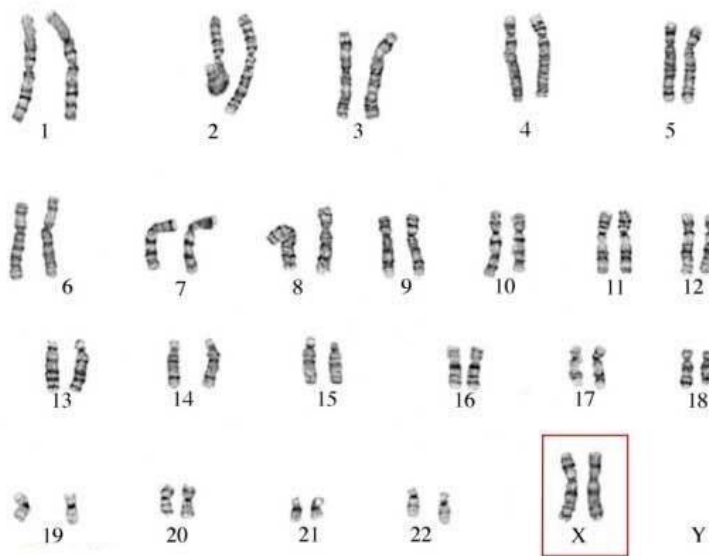
4.2. Preparatların Boyanması ve Değerlendirilmesi

Boyama yöntemi olarak Giemsa düz boyama yöntemi kullanılmıştır. Düz boya için 95 ml distile suya 5 ml giemsa lösing eklenerek boya tamponu hazırlanmış ve 5 dakika boya tamponunda bekletilen preparatlar distile sudan geçirilerek kurumaya bırakılmıştır.

İncelenmeye hazır preparatlar mikroskoba yerleştirilerek yeterli sayıda tarama yapıp her bir hasta için 20 ile 40 arası metafaz evresi bulduktan sonra resimleri çekilmiş, sayısal ve yapısal anomalileri belirlenerek değerlendirmeye alınan hastaların karyotipleri çıkarılmıştır.

4.3. Karyotiplerin Belirlenmesi

Mikroskop altında değerlendirilen uygun metafazlar 100 lük objektifde analiz edildikten sonra karyotipleri belirlenir ve arşive alınır.



Şekil 6: Normal Dişi Karyotipi

4.4. DNA İzolasyonu

1. EDTA'lı tüplerdeki kan 50 ml'lik falkon tüplere alındı.
2. Falkon tüplerin üstüne 35- 40 cc ye gelene kadar Reaktif A eklendi.
3. Tüpler 2 dk elle karıştırıldı.
4. 3000 rpm' de +4 °C' de 10 dk santrifüj edildi.
5. Santrifügasyon sonrası falkon tüplerdeki pellete zarar vermeyecek şekilde süpernatant kısmı, içerisinde çamaşır suyu olan behere boşaltıldı.
6. Kalan kısım üzerine 2 ml Reaktif B eklenip, pipetaj yapıldı.
7. Her bir hastanın tüpü 15 ml'lik falkon tüplere aktarıldı.
8. Tüplerin üstüne 500 µl Sodyum Perklorat eklendi.
9. Tüpler oda sıcaklığında 15 dk. boyunca karışması için roller mix e bırakıldı.
10. İçeriği karışmış olan tüpler daha önce 65 °C ye ayarlanan benmaride 30 dk inkübasyona bırakıldı.
11. Benmariden çıkarılan her tüpe 2 ml kloroform eklendi.
12. 10 dk rollermix te karıştırıldı.
13. 1400 rpm' de 15°C-20°C' de 10 dk satrifüj edildi.
14. Santrifüj sonrası üstte kalan DNA içeren berrak faz pastör pipetiyle başka bir tüpe aktarıldı.
15. Tüplerin üstüne 4°C' de muhafaza edilen 2 ml etanol eklendi ve hafifçe elle alt üst edildi.
16. Plastik özeyle tüp içerisindeki DNA'lar hafif dairesel hareketlerle toplandı.
17. 1,5 ml'lik eppendorf tüpe ucunda DNA bulunan öze tersten bırakılarak 3 dk bekletilerek kuruması sağlandı.
18. Üzerinde DNA bulunan öze, ucundan kesilerek eppendorf tüpün içine bırakıldı ve üstüne 200 ml distile su eklendi.

4.5. Real-Time PCR ile Gen Analizleri

DAX1'in exon 1 bölgesindeki 1133A>G (p.Tyr378Cys) mutasyonu ve WNT4'ün exon 2 bölgesindeki 341C>T (p.Ala114Val) mutasyonlarının belirlenebilmesi için Real Time PCR cihazında SYBR Green metodu uygulandı.

Her bir stok çalışma için hacim 20 µl olarak belirlendi. Stokun içeriği Tablo 1'de gösterilmiştir. Bu 20 µl'nin 7 µl si su, 2 µl DNA, 1 µl primer, 10 µl SyberGreen MasterMix tir.

Tablo 1: PCR Gen Analizinde Kullanılacak Stok İçeriği

Madde	Miktar
Tek Kullanımlık Enjeksiyon Suyu	7 µl
DNA	2 µl
Primer	1 µl
Sybergreen Mastermix	10 µl

Karışım çalışmanın daha kolay yapılabilmesi için öncelikle DNA sız DAX1 ve WNT4 primerleri içeren toplam hasta sayısı kadar 5 ml'lik eppendorf tüplere bırakılarak stok oluşturuldu. Daha sonra soğuk blok üzerine yerleştirilen strip tüplerin içine 19 µl stok ile birlikte 1 µl primer eklenerek toplamda 20 µl'lik PCR kitimiz hazır hale gelmiş oldu. PCR kabin ve kullanılan malzemeler Resim 1'de gösterilmiştir.



Resim 1: PCR Kabini ve Kullanılan Malzemeler

4.5.1. Kitlerin Rt- PCR Sistem Makinesinde Okunması

16 hasta, bir kadın kontrol bir de erkek kontrol ile birlikte toplamda 18 tüp DAX1 geni için, 18 tüp WNT4 geni için, 72 lik döner tablaya yerleştirildikten sonra The Rotor-Gene Q Qiagen Real Time PCR makinesine bırakılarak PCR analizi için gerekli veriler girilerek başlatıldı. DAX1 geninin 1. exon ve WNT4 geninin 2. exon bölgesinde bulunan primer dizileri tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: DAX1 ve WNT4 Genlerinin Primer Dizileri

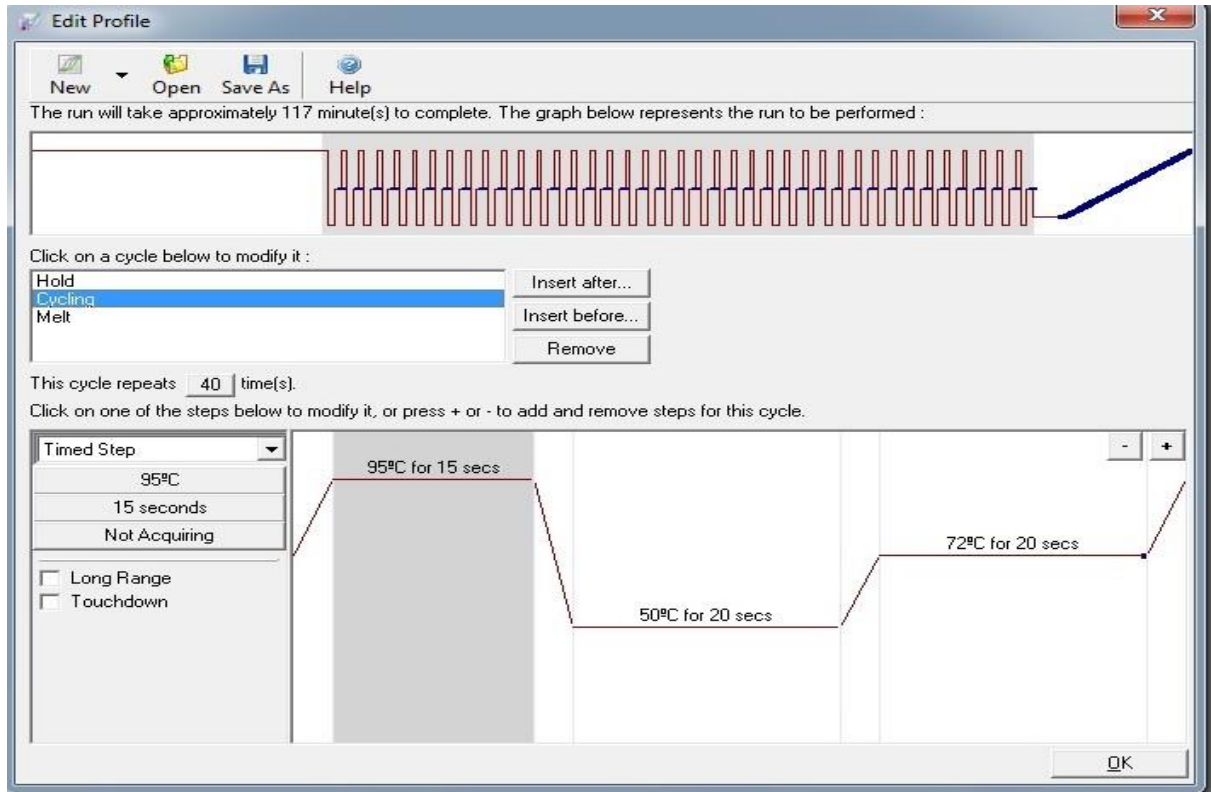
DAX1	F: 5’- GGAGGAGCGGCCTGAGGGC -3’
	R: 5’- CAATCATTTTCCTTCCCTTTTCC -3’
WNT4	F: 5’- ATCCAGAGAGAAGTCGGCAGCC -3’
	R: 5’- CCCGTTGCTCACGAGCGTCTC -3’

4.5.2. PCR Döngü ve Erime Eğrisi Değerleri

Her genin kendine özgü standart döngü koşulları ve erime değerleri vardır. Bu değerler optimum değere ulaşıldıktan sonra protokole uygun şekilde gerçekleştirilir. DAX1 ve WNT4 genlerinin PCR döngü değerleri Tablo 3’te ve Şekil 7’de verilmiştir. Erime (melting) değerleri Şekil 8’ de verilmiştir.

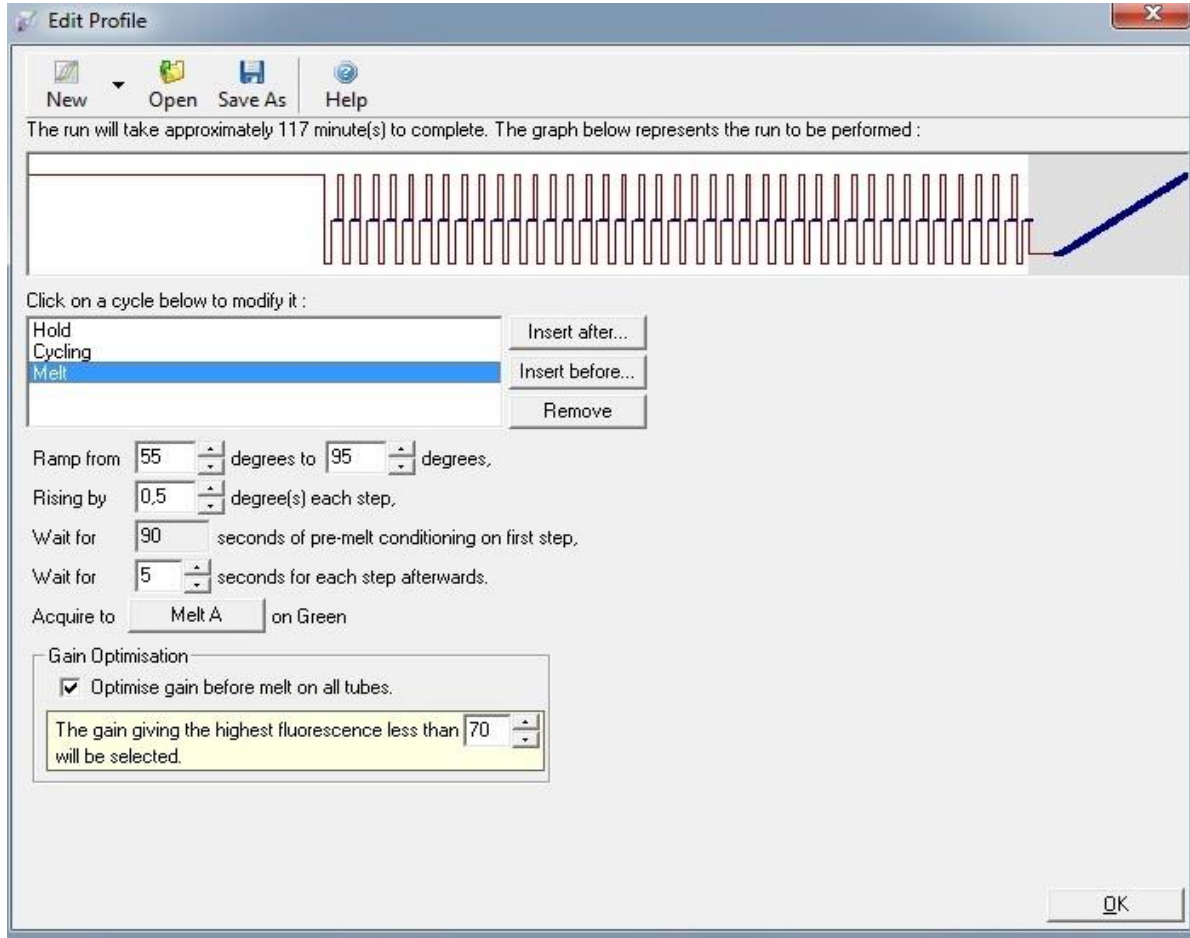
Tablo 3: PCR Döngü Değerleri

Adım	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95°C	15 sn	1
Annealing	50°C	20 sn	40
Uzama	72°C	20 sn	40



Şekil 7: PCR Döngü Değerleri

Erime eğrisi analizi, SYBR-Green boyaların kullanıldığı analizlerde, çoğalan DNA'nın hedef bölge olduğunu kesinleştirmek amacıyla kullanılır. Erime eğrisi analizinde, ikili sarmal DNA örneğinin sıcaklığı yavaş yavaş artırılarak floresan sinyalin sıcaklığa bağlı değişimini gösteren bir grafik oluşturulur. Floresan sinyalin ani düşüşünden kaynaklanan tepcikler aracılığıyla, DNA iplikçiklerinin birbirlerinden ayrılmaları gözlemlenir.



Şekil 8: Erime Eğrisi Analizi Değerleri (Melt Curve Analysis)

5. BULGULAR

Çalışmamız Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Tanı Laboratuvarına yönlendirilen cinsel gelişim bozukluğuna sahip 61 hastayı kapsamaktadır. Çalışma grubumuzdaki 61 hastaya sitogenetik analiz yapmak için hastalardan alınan periferik kandan lenfosit kültürü yöntemi ile karyotip analizi yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi. Yaptığımız sitogenetik analiz sonucunda cinsiyet anomalisi tanısı ile gelen 61 hastadan on altısında 46,XX karyotipi tespit edildi. Bu hastalardaki DAX1 ve WNT4 gen mutasyonu analizlerinde, hem DAX1 geninin exon 1'deki p.Tyr378Cys bölgesinde hem de WNT4 geninin exon 2'deki 341C>T (p.Ala114Val) bölgelerinde mutasyon olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca çalışma grubumuzdaki 46,XX karyotipli 16 hastanın klinik kayıtlarında beş kişide SRY pozitif olduğu tespit edilmiştir.

5.1. Sitogenetik Sonuçlar

Çalışmaya dahil 61 hastanın; 42 tanesi 46,XY karyotipli (%68,85), 16 tanesi 46,XX karyotipli (%26,22), 1 tanesi 46,XXY karyotipli (%1,63), 1 tanesi 45,X karyotipli (%1,63), 1 tanesi de 45,X/47,XXX karyotipli (%1,63) olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara sahip hastalardan yalnızca 46,XX karyotipine sahip 16 bireyin DAX1 ve WNT4 genlerinde mutasyon analizi yapıldı.

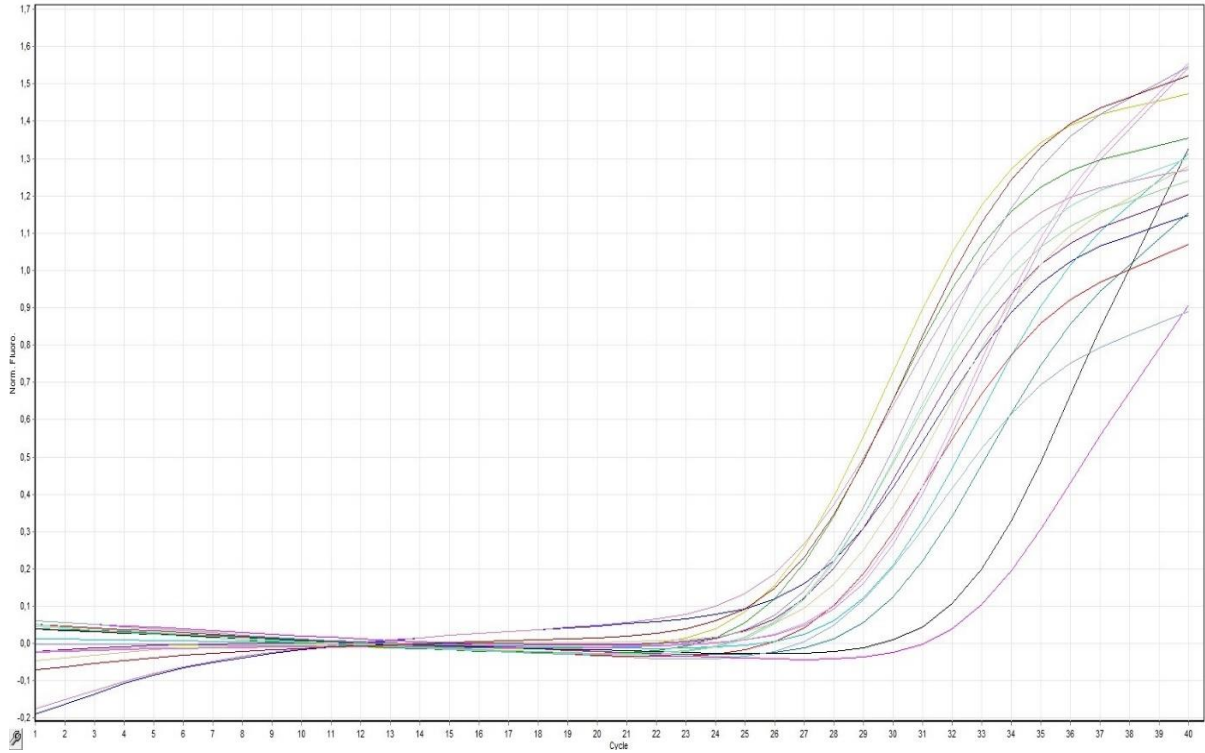
Tablo 4: Sitogenetik sonuçlar ve yüzdeleri

Karyotip	Frekans	Yüzde
46,XY	42	% 68,85
46,XX	16	% 26,22
46,XXY	1	% 1,63
45,X	1	% 1,63
45,X/47,XXX	1	% 1,63
Toplam	61	% 100

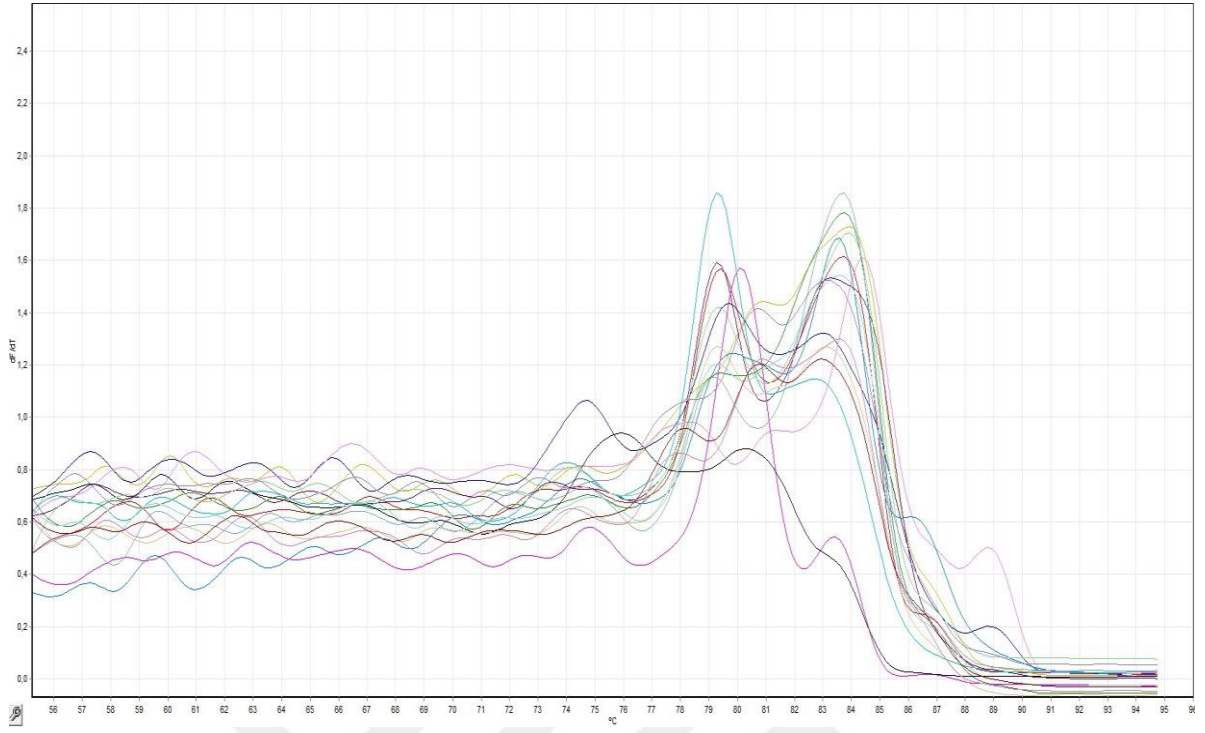
5.2. Real Time PCR’da Gözlenen Gen Mutasyon Analizleri

5.3. DAX1 Gen Mutasyon Analizi

DAX1 geninin primer bağlanma eğrileri Şekil 9’da, erime eğrisi Şekil 10’da verilmiştir. Kontrol gurubu olarak normal kadın ve erkeğin kullanıldığı çalışma gurubumuzda yapılan RT-PCR testleri sonucu tüm bireylerde DAX1 geninde mutasyon bulunmaması nedeniyle çalışılan tüm bireylerde PCR eğrilerinin pik verdiği görülmektedir (Şekil-9 ve Şekil-10). Dolayısıyla çalışma gurubumuzdaki 46,XX karyotipine sahip 16 bireyde, incelenen DAX1 geninde fonksiyon kaybına neden olabilecek exon 1 bölgesindeki p.Tyr378Cys mutasyonunun olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 9: DAX1 Geni Primer Bağlanma Eğrileri

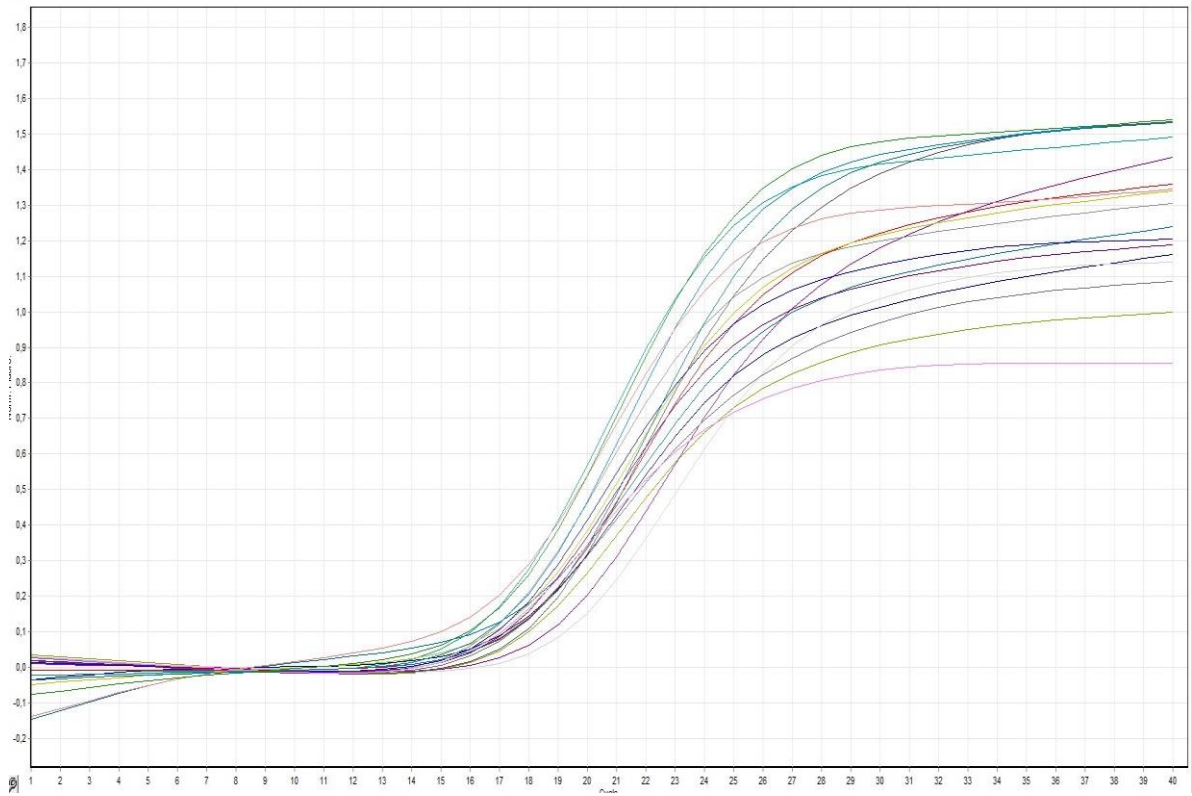


Şekil 10: DAX1 Genin Erime Eğrisi

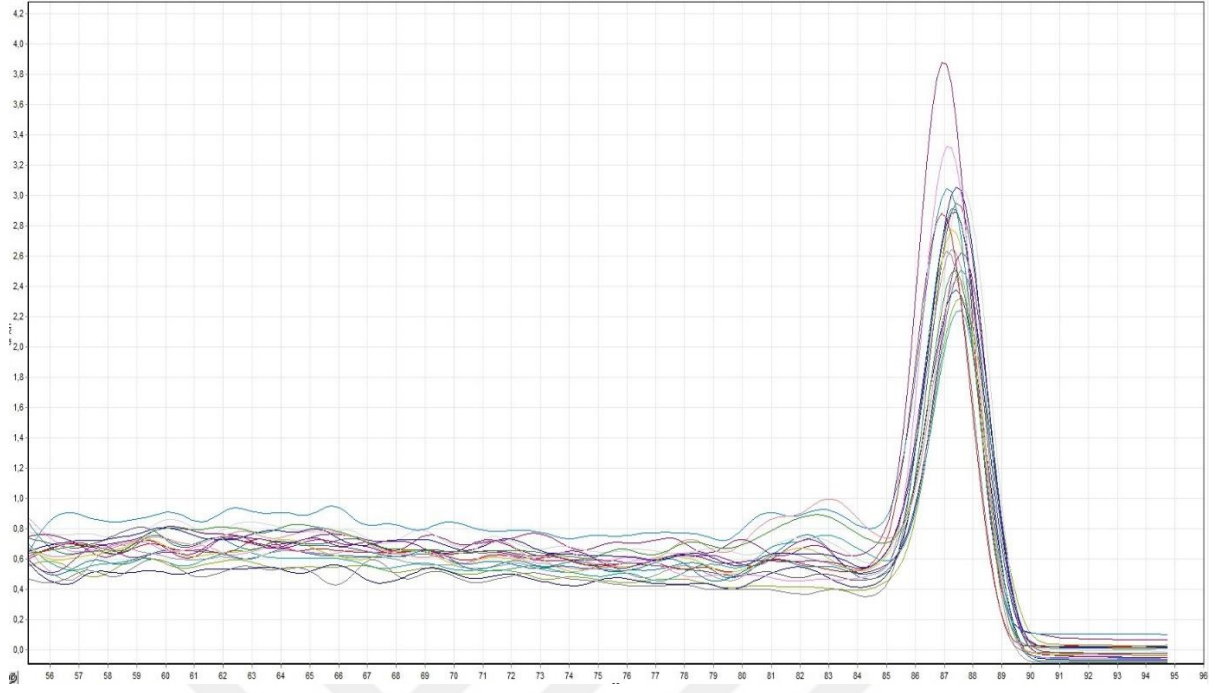
5.4. WNT4 Gen Mutasyon Analizi

WNT4 geni primer bağlanma eğrileri Şekil 11’de verilmiştir. Erime eğrisi Şekil 12’de verilmiştir.

Kontrol gurubu olarak normal kadın ve erkeğin kullanıldığı çalışma gurubumuzda yapılan RT-PCR testleri sonucu tüm bireylerde WNT4 geninde mutasyon bulunmaması nedeniyle çalışılan tüm bireylerde PCR eğrilerinin pik verdiği görülmektedir (Şekil-11 ve Şekil-12). Dolayısıyla çalışma gurubumuzdaki 46,XX karyotipine sahip 16 bireyde, incelenen WNT4 geninde fonksiyon kaybına neden olabilecek exon 2 bölgesindeki 341C>T (p.Ala114Val) mutasyonunun olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 11: WNT4 Geni Primer Bağlanma Eğrileri



Şekil 12: WNT4 Geni Erime Eğrisi

6. TARTIŞMA

Cinsel gelişim bozukluğu dış genital yapı ile gonad morfolojisi arasındaki uyumsuzluk olarak bilinmektedir (2). CGB çok geniş klinik spektrumda karşımıza çıkabilir. Genotipik bir dişi CGB sonucu tamamen erkek görünümünde olabileceği gibi, genotipik bir erkek te tamamıyla dişi görünümünde olabilir.

Cinsiyet gelişim bozuklukları karyotipe göre cinsiyet kromozomlarına bağlı CGB, 46, XY CGB ve 46, XX CGB şeklinde sınıflandırılabilir. Çalışılan 61 hastanın 16'sı 46,XX CGB (%26,22), 42'si 46,XY CGB (%68,85), 3'ü kromozomlara bağlı CGB'na (%4,89) sahip olduğu tespit edilmiştir.

46,XX CGB kendi içinde over gelişim bozuklukları, androjen fazlalığı ve bazı sendromlar ya da genetik anomaliler olarak gruplandırılmıştır. Kuşkulu genital yapının en sık nedeni cinsiyet steroid biyosentezindeki enzim eksikleri ve eksik olan enzim basamağının gerisindeki öncül hormonların özellikle de androjen prekürsörlerinin artmasıdır. Androjen hormon üretiminde artışa bağlı dişide virilizasyona sebep olan KAH kuşkulu genitalyanın en sık sebebidir (43).

Virilizan KAH'da steroid sentezinde eksikliğe neden olan enzimler ve 12 mutasyonları; 21-hidroksilaz eksikliği (CYP21), 11 β -hidroksilaz eksikliği (CYP11B1), 3 β hidroksisteroid dehidrojenaz 2 eksikliği (HSD3B2), P450 oksidoredüktaz (POR) eksikliğidir (44). Aynı zamanda plesantal aromataz eksikliği (CYP19) ve POR eksikliği de fetoplesantal androjen artışına ve 46,XX fetusta virilizasyona neden olur (43).

Maternal virilizan tümörler ve gebelikte kullanılan androjenik ilaçlar da dişi fetüsü virilize edebilmektedir (44). Bunların dışında kloakal anomaliler, Müllerian ageneziler (MURCS), uterus anomalileri, labial adezyonlar, vajinal atrezi (McKusick-Kaufman sendromu) gibi sendromik bozukluklar 46,XX CGB sınıfında yer alırlar (44).

Çalışmamızda DAX1 ve WNT4 genlerinde mutasyon analizi yapılmış olup bu genlerde söz konusu mutasyonlar tespit edilmemiştir. Ancak vakalarda görülen CGB'nin genetik etiolojisinin tam olarak anlaşılabilmesi için CYP21, CYP11B1, HSD3B2, POR CYP19 ve POR genleri gibi genlerin de analiz edilmesi gerekmektedir.

Cinsiyet gelişim bozukluğu olan hastaların tanısının erken konması, hem metabolik hem de çocuğun doğru cinsel gelişim yönünün belirlenmesi açısından çok önemlidir. Sorun her zaman fenotipik olarak belirgin olamayabilir ve dış genital yapılarında belirgin bir anormallik içermeyenlerin tanısı genellikle gecikir. Bu nedenle cinsiyet gelişim bozukluğunun erken tanısı için yeni doğan her bebeğin ayrıntılı genitoüriner sistem muayenesinin yapılması gereklidir (33). Bizim çalışma grubumuzdaki hastalar kuşkulu genitalya, KAH ve intersex gibi CGB ön tanılarıyla gelmiştir.

Genel olarak, memelilerde cinsiyet tayini, bipotansiyelli embriyonik gonadın ya erkek ya da dişi farklılaşmaya bağlı olarak, embriyogenez sırasında başlar. Bu sürecin başlangıcı, karmaşık bir gen ağını içerir. Gonadların ve diğer cinsiyete özgü anatomik yapıların ve bireyin dış genital organlarının uygun gelişimi için bunların uygun bir şekilde düzenlenmesi gereklidir. En basit anlamda CGB tanımı fenotipik cinsiyet (makroskopik veya somatik) ile genotipik cinsiyet (kromozom ve genetik dizilim) arasındaki uyumsuzluktur.

Poaty H. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada konjenital adrenal hiperplazide, adrenal androjenlerin aşırı biyosentezinin, 46,XX'de cinsel organları erkekleştirdiğini tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada 46,XY CGB de, testislerin mevcut olduğunu ancak dış genital organlar neredeyse dişi olduğunu. 46,XX CGB olan grupta, yumurtalıkların varlığına dikkat çekmiş ancak dış genital organlar bazen vajinal boşlukların tıkanması ile birlikte tamamen erkek tipinde olduğunu. Son grup olan ovotestiküler CGB'da ise hem yumurtalık hem de testis dokularının aynı gonadda bir arada bulunduğunu belirtmişlerdir.(37).

Normal sağlıklı bireyde XX gonadda, düşük AMH seviyeleri ve testosteron yokluğu Wolffian kanallarının kıvrılmasına ve Müllerian kanallarının ovidukt, uterus ve vajinanın üst kısmını oluşturacak şekilde gelişmesine neden olur. Androjenlerin yokluğu, dış kadın cinsel organlarının gelişmesine neden olur. WNT4'teki fonksiyon kaybı mutasyonları, virilize edilmiş ve Müllerian yapıları olmayan 46,XX bireylerde tanımlanmıştır (38).

46,XX CGB birey erkeklerin yaklaşık %90'ı SRY gen taşıyıcısıdır. Bizim çalışma grubumuzdaki 46,XX karyotipli 16 hastanın klinik kayıtlarında beşinde (%32,3) SRY geninin pozitif olduğu bildirilmektedir. Çoğunlukla bu durum peternal spermatogezde mayoz sırasında cinsiyet kromozomların psödootozomal bölgeleri arasındaki dengesiz crossing-over sonucu SRY geninin X kromozomuna translokasyonu sonucu oluşur (39).

DAX1 geni her iki gonad gelişiminde de gereklidir. Ancak yüksek dozda DAX1 ekspresyonu SF1'i antagonize ederek testis gelişiminde bozulmaya ve 46,XY bireylerde CGB'ye yol açar. DAX1 geni SRY tarafından inaktif tutulur ve böylece bir erkek gonadal farklılaşma yolu izlenir. Aktif bir X kromozomunda fazladan bir kopya ortaya çıkarsa, DAX1 SF1'i antagonize eder ve dişi bir yol izlenir. Daha sonra DAX1 doz aşımı TES'i baskılar ve böylece SOX9 inaktive olur ve testis oluşumu bloke olur (34). Çalışma grubumuzdaki hastalardan SRY'si pozitif olan ve testiküler feminizasyon ile ovotestis ön tanısı almış bireylerde yine DAX1 ve WNT4 gen bölgelerinde mutasyona rastlanmamıştır. Burada DAX1 geninin overeksprese olmadığı bu yüzden SRY'yi baskılamadığı düşünülmektedir.

Günümüzde over gelişiminde rol aldığı bilinen genler WNT4, RSPO1, FOXL2'dir. WNT4 geni DAX1'i arttırarak SF1'i antagonize eder ve bu şekilde testis gelişimini engeller. WNT4 genindeki fonksiyon kaybına neden olan delesyonlar, XX dişi fare embriyosunun cinsiyetini tersine çevirdiği ve bazı erkek özelliklerinin sergilenmesine neden olduğu gösterildi (35, 40). Çalışmamızda DAX1 ve WNT4 genlerinde mutasyonlar tespit edilememiştir. Ancak vakalarda görülen CGB'nin genetik etiyolojisinin tam olarak anlaşılabilmesi için aynı zamanda CYP21, CYP11B1, HSD3B2, POR CYP19 ve POR genleri gibi genlerin de analiz edilmesi gerekmektedir.

7. SONUÇ

Genetik analizler, insan cinsel gelişiminde çeşitli genlerin ve gen dozajlarının önemli olduğunu ortaya çıkarmıştır. Disgenetik gonadların gelişimi ile ilgili önemli genlerden iki tanesi de DAX1 ve WNT4 genleridir. Çalışmamızda DAX1'in exon 1 bölgesindeki p.Tyr378Cys mutasyonu ve WNT4 exon 2 bölgesindeki p.Ala114Val olası mutasyonları analiz edilmiş olup bu genlerde söz konusu mutasyonlar tespit edilememiştir. Oysa bu genlerin dozajlarının da CGB hastalarda gonad gelişiminin etiyolojisinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle bu genlerin dozajlarının belirlenmesi ve cinsiyet belirleme kademesinde rol oynayan diğer genlerin de analiz edilmesi gerekmektedir. Hasta grubumuz içindeki SRY pozitif olan 5 hastanın ovotestis (testiküler CGB) ön tanılı olarak geldiği bilindiği geriye kalan hastaların CGB nedeninin fetal kaynaklı 21-Hidroksilaz eksikliği, 11β-Hidroksilaz eksikliği, 3β-Hidroksisisteroid dehidrogenaz eksikliği, aromataz eksikliği ve maternal kaynaklı aşırı androjen üretiminden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Genel olarak, cinsel gelişim bozukluklarının çoğunda genetik etiyoloji bilinmemektedir ve yine ilgili genetik yollar hakkındaki bilgi zayıflığı bu tür rahatsızlıkların kesin sonucuyla alakalı verilerin daha çok çalışılmasını gerektirmektedir.

Yaptığımız çalışma bu gen bölgeleri ile yapılacak olan cinsiyet tayini ile ilgili diğer çalışmalara ek bilgi sağlayacaktır. Buna bağlı olarak ihtiyacı olan bireylere uygun genetik danışma verilerek kişiye, ailesine ve gelecek kuşaklara bu tür hastalıklar hakkında farkındalık oluşturulması sağlanabilir. Bu bulgu ayrıca, cinsiyet belirlemenin birden fazla genetik faktör tarafından düzenlenen karmaşık bir süreç olduğunu da göstermektedir.

8. KAYNAKLAR

- (1) Vogel F, Motulsky AG. Human genetics. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 1998.
- (2) Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. Hereditas 1956; 42: 1-6.
- (3) Ruth M. Baxter, Eric Vilain. Translational Genetics for Diagnosis of Human Disorders of Sex Development. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2013; 14: 371-392.
- (4) Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA. Consensus statement on management of intersex disorders. J Pediatr Urol. 2006; 2:148–62.
- (5) Valerie A, Arboleda David E, Sandberg, Eric Vilain. DSDs: genetics, underlying pathologies and psychosexual differentiation. Nat Rev Endocrinol. 2014; 10(10): 603–615.
- (6) Kropf S, Kleinemeier E, Jurgensen M, Thyen U. Clinical evaluation study of the German network of disorders of sex development (DSD)/intersexuality: study design, description of the study population, and data quality. BMC Public Health. 2009; 9:110.
- (7) Clepet C et al. The Human SRY Transcript. Hum Mol Genet. 1993;2: 2007-2012.
- (8) McElreavy K, et al. XY sex reversal associated with a deletion 5' to the SRY "HMG box" in the testis-determining region. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89:11016–11020.
- (9) Wagner T, et al. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. Cell. 1994; 79:1111–1120.
- (10) Couch RM., Winter JSD. Sexual Differentiation. Feling P., Frohman LA (eds). Endocrinology Metabolism, 4th ed. McGraw-Hill companies, United State.2001; pp.779-817.
- (11) Peter N Schlege. The Y chromosome. Reproductive BioMedicine Online.2002; (5): 22–25.
- (12) Yaşar E. Kuşkulu Genital Yapılı Olguların Demografik Ve Klinik Özelliklerinin, Tanı Ve Cinsel Kimliğin Belirlenmesinde Etkin Faktörlerin Araştırılması. İ.Ü. Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2010, Diyarbakır (Danışman: Prof.Dr. H. Nurçin SAKA)
- (13) Lodish Krieger K, Bretscher A, Matsudaira P. Moleküler hücre biyolojisi, Çeviri Editörleri, Geçkil H, Özmen M, Yeşilada Ö. Palme Yayıncılık, Ankara: 2011, sf: 372- 485.
- (14) Forest MG., Quigley CA. Diagnosis and treatment of Disorders of Sexual Development. Genetic basis of Sex Determination and Differentiation in: Groot LJD, Jameson JL, Burger HG. Odel WD. Endocrinology, 4th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders. 2001: pp.1885 -2001.
- (15) Dagmar Wilhelm, Stephen Palmer, Peter Koopman. Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. Physiol Rev. 2007; (87): 1–28.
- (16) Zgrab makıyan. Studies of gonadal sex differentiation. Organogenesis. 2016 Jan; 12(1): 42–51.

- (17) Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. Pediatrics. 2006; (118): 488–500.
- (18) Thomas Ohnesorg. Eric Vilain. Andrew H. Sinclair. The Genetics of Disorders of Sex Development in Humans. Sex Dev. 2014; (8):262–272.
- (19) Zhen-Yu She, Wan-Xi Yang. Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. Journal of Molecular Endocrinology. 2014; 53: 21-37.
- (20) Harry Ostrer. Disorders of Sex Development (DSDs): An Update. Clin Endocrinol Metab. 2014; 99(5): 1503-1509.
- (21) Gao X, et al. Clinical, cytogenetic, and molecular analysis with 46,XX male sex reversal syndrome: case reports. J Assist Reprod Genet. 2013; 30: 431–435.
- (22) Swain A. Zanaria E. Hacker A. Lovell-Badge R. Camerino G. Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. Nat Genet. 1996; 12: 404–409.
- (23) F.N. DİLEK. 46,XY Dişi Fenotipli Hastalarda Etiyolojik Faktörlerin Araştırılması. Gazi Üniversitesi. Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2014, Ankara (Danışman: Prof.Dr. E. Ferda PERÇİN).
- (24) Guo W, et al. Diagnosis of X-linked adrenal hypoplasia congenita by mutation analysis of the DAX1 gene. JAMA. 1995; 274: 324–330.
- (25) S. Domenice, R.V. Correa, E.M.F. Costa, M.Y. Nishi, E. Vilain, I.J.P. Arnhold and B.B. Mendonca. Mutations in the SRY, DAX1, SF1 and WNT4 genes in Brazilian sex-reversed patients. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2004; 37: 145-15.
- (26) Jaaskelainen, M. Prunskaitė-Hyyryäinen, R. Naillat, F. Parviainen, H. Anttonen, M. Heikinheimo, M. Liakka, A. Ola, R. Vainio, S. Vaskivuo, T.E. Tapanainen, J.S. WNT4 is Expressed in Human Fetal and Adult Ovaries and Its Signaling Contributes to Ovarian Cell Survival. Molecular and Cellular Endocrinology. 2010; (2): 106.
- (27) Carrillo AA. Berkovitz GD. Disorder of Sexual Differentiation. Pediatric Endocrinology. 2003; sf: 319-34.
- (28) Anna Biason-Lauber. WNT4, RSPO1, and FOXL2 in Sex Development. Semin Reprod Med. 2012; 30: 387-395.
- (29) Preeti Paliwal. Anshul Sharma. Shweta Birla. Alka Kriplani. Rajesh Khadgawat. Arundhati Sharma. Identification of novel SRY mutations and SF1 (NR5A1) changes in patients with pure gonadal dysgenesis and 46,XY karyotype. Molecular Human Reproduction. 2011; (17): 372–378.
- (30) Gönül Ç, Ahmet A, Ayha, A, Nechama S, Ece B. X-Linked Adrenal Hypoplasia Congenita and Hypogonadotropic Hypogonadism: Mutation of the DAX-1 Gene in a Patient. Türkiye Klinikleri J Pediatr. 2014; 23(3): 134-7.
- (31) <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/WNT4>, Erişim tarihi: 2 Haziran 2021.
- (32) <https://tr.warbletoncouncil.org/cariotipo-3951>, Erişim tarihi 8 Haziran 2021.

(33) İlknur BANLI CESUR. Cinsel Gelişim Bozukluğu Olan Çocuklarda Tedavi Yönetim. Ç.Ü. Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 211, Adana (Danışman: Prof. Dr. Ünal ZORLUDEMİR).

(34) Ludbrook L, Bernard P, Bagheri-Fam S, Ryan J, Sekido R, Wilhelm D, Lovell-Badge R, Harley VR. Excess DAX1 leads to XY ovotesticular disorder of sex development (DSD) in mice by inhibiting steroidogenic factor-1 (SF1) activation of the testis enhancer of SRY-box-9 (Sox9). *Endocrinology*. 2012; 153(4):1948–1958.

(35) Renata Prunskaitė-Hyryläinen. Role Of Wnt4 Signaling In Mammalian Sex Determination, Ovariogenesis And Female Sex Duct Differentiation. *Acta Univ. Oul.* 2014.

(36) Selma Feldman Witchel. Disorders Of Sex Development. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2018; 48: 90-102.

(37) Poaty H, Ondima I, Moyen E, Demba Diop, Moukouma C, Ndiaye R. Disorders of Sex Development in an Infant (46, XX) - A Case Report and Review of Literature. *Human Genet Embryol*. 2017; 7:3.

(38) Nathalia Lisboa Gomes, Tarini Chetty, Anne Jorgensen, Rod T Mitchell. Disorders of Sex Development—Novel Regulators, Impacts on Fertility, and Options for Fertility Preservation. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21, 2282.

(39) Cresio Alves, Zilda Braid, Fernanda Borchers Coeli, Maricilda Palandi de Mello. 46,XX Male – Testicular Disorder of Sexual Differentiation (DSD): hormonal, molecular and cytogenetic studies. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2010; 54/8.

(40) Metin Eser, Akif Ayaz. Haploinsufficiency of the DMRT Gene Cluster in a Case with 46,XY Ovotesticular Disorder of Sexual Development. *Balkan Med J*. 2018; (35):272-4.

(41) Yasuhiro Nakamura, Claudia Vargas Morris, Hironobu Sasano, William E Rainey. DAX1A (NR0B1A) expression levels are low compared to DAX1 (NR0B1) in human steroidogenic tissues. *Horm Metab Res*. 2009; 41(1): 30–34.

(42) Edmund U-H Sim, Aaron Smith, Elida Szilagi, Fiona Rae, Panos Ioannou, Megan H Lindsay, Melissa H Little. Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. *Oncogene*. 2002; 21: 2948 – 2960.

(43) Bahriye U. Cinsiyet Gelişim Bozukluğu Olan Hastaların Klinik ve Laboratuvar Bulgularının Değerlendirilmesi. İ.Ü. Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2020, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Şükran POYRAZOĞLU)

(44) Hughes IA. Disorders of sex development: a new definition and classification. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008; 22:119-134.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Ahmet Serhat	Soyadı	BAYAR
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu	T.C.	Tel	
E-posta			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Tezli Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2013
Lisans	Dicle Üniversitesi	2011
Lise	80. Yıl Cumhuriyet Lisesi	2004

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)

Yabancı Dil Sınav Notu

KPDS/ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

10.1. Orijinallik Raporu

tez

ORIJINALLİK RAPORU

% 12	% 12	% 2	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%2
2	babaliktestidna.com İnternet Kaynağı	%2
3	acikerisim.dicle.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
4	tr.warbletoncouncil.org İnternet Kaynağı	%1
5	www.slideshare.net İnternet Kaynağı	%1
6	www.baskent-ank.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
7	www.ejmanager.com İnternet Kaynağı	%1
8	nevsehir.mitosweb.com İnternet Kaynağı	%1
9	biyoteknolojininrenkleri.com İnternet Kaynağı	<%1

10	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
11	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
12	BAHÇE, Muhterem, TUNCA, Yusuf, GÜL, Davut, İMİRZALIOĞLU, Necat, TAŞÇILAR, M. Emre, BOLU, Erol, SAMEDLİ, Samed, KOZAN, Salih, TORUN, Deniz and GÜRAN, Şefik. "Cinsel farklılaşma bozukluğu olan olgularda genetik yaklaşım", Gülhane Askeri Tıp Akademisi, 2009. Yayın	<%1
13	molekulce.com İnternet Kaynağı	<%1

Alıntıları çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

Kapat

Bibliyografyayı Çıkart üzerinde

10.2. Etik Kurul Onay Raporu

**DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK
ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
DİCLE UNIVERSITY MEDICAL FACULTY ETHICS COMMITTEE FOR
NONINTERVENTIONAL STUDIES**

296

KARAR

Prof. Dr. Mahmut BALKAN, Ahmet Serhat BAYAR isimli araştırmacılar tarafından planlanan "Cinsiyet anomalisi olup 46,XX karyotipine sahip hastalarda DAX1 ve WNT4 tüm gen analizi" başlıklı araştırmaya Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u tarafından toplantıda hazır bulunan üyeler tarafından oy birliği ile onay verilmiştir.

Klinik araştırma tamamlanıp yayın aşamasına geldiğinde, yayına sunulan bildiri veya makalenin bir örneğinin Etik Kurul'a verilmesi zorunludur.

DECISION

The project titled as "Whole gene analysis of DAX1 and WNT4 in patients with karyotype of 46,XX with sex abnormality" planned by Mahmut BALKAN, Ahmet Serhat BAYAR has been approved by Ethics Committee of Dicle University Faculty of Medicine.

Oturum No (Meeting
number):

Tarih (Date): 27.05.2021

Saat (Hour): 14:00-17:00

KURUL BAŞKANI (CHIEF)

Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

KURUL ÜYELERİ / MEMBERS

	ÜNVANI	ADI-SOYADI	KURUMU	BRANŞI	İMZA
1	Prof. Dr.	Meral ERDİNÇ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Farmakoloji	
2	Prof. Dr.	Zeynep BAYSAL YILDIRIM	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	
3	Prof. Dr.	Zaferkan YILMAZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	İç Hastalıkları	
4	Doç. Dr.	M. Veysi BAHADIR	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Genel Cerrahi	
5	Doç. Dr.	İbrahim KAPLAN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyokimya	
6	Dr. Öğretim Üyesi	İsmail YILDIZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyoistatistik	
7	Dr. Öğretim Üyesi	Diclehan ORAL	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji	
8	Dr. Öğretim Üyesi	Gülşay AYDOĞDU	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Patoloji	
9	Dr. Öğretim Üyesi	Muhammed Akif DENİZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Radyoloji	
10	Avukat	Ronay TEKALP	Dicle Üniversitesi Hastaneleri	Hukuk İşleri Birimi	

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası Zemin Kat 21280 Kampüs/DİYARBAKIR
Telefon: +90.412 . 248 80 01-16/4631 Faks: +90.412. 248 84 40 kuruletikdiyar@gmail.com

10.3. Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu

Sizi Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı tarafından yürütülen “CİNSİYET ANOMALİSİ OLUP 46,XX KARYOTİPİNE SAHİP HASTALARDA DAX1 VE WNT4 GEN ANALİZİ” başlıklı araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz.

Sitogenetik analiz sonucu 46,XX karyotipindeki hastaların DAX1 ve WNT4 genlerinin analizini yapıp, cinsel gelişim bozukluğuna olan etkisini saptayarak elde edilecek verilerin incelenmesi ve derlenmesi ile toplanacak bilgilerin bilimsel çalışmalara katkısı amacıyla sizlerin vereceği kan örnekleri bu araştırmaya büyük bir etki sağlayacaktır.

Bağışlayacağınız kan örneğiyle, çalışmaların sonuçlarından herhangi bir ticari kazanç beklememeyi de taahhüt ediyorsunuz. Bu çalışmaya katılmak için herhangi bir ücret ödemeniz de gerekmemektedir.

Bu çalışmayı yapabilmek için kolunuzdan 10 ml (1 tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. Kol damarınızdan kan alınması sırasında iğne batmasına bağlı olarak biraz acı duyabilirsiniz. Az bir ihtimal de olsa, iğne batması sonrasında kanamanın uzaması, iğne batan yerde geçici bir morluk gelişmesi ya da çok daha nadir olarak enfeksiyon riski bulunmaktadır.

Prof. Dr. Mahmut BALKAN ve Sorumlu Araştırmacı Yüksek Lisans öğrencisi Ahmet Serhat BAYAR tarafından Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında ortak olarak yürütülecek bu genetik araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam genetikçi ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını bilincindeyim). Bu durumda genetik malzememle ilgili çalışma araştırmanın en yakın aşaması tamamlandığında sonlandırılacaktır.

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

Bu çalışmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan çıkma hakkına sahipsiniz.

Çalışmayı yanıtlamanız, araştırmaya katılım için onay verdiğiniz biçiminde yorumlanacaktır. Size verilen formlardaki soruları yanıtlarken kimsenin baskısı veya telkini altında olmayın. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacaktır. Sizden alınacak kan örneği sadece çalışmada belirtilen amaç için kullanılacaktır. İlave bir inceleme yapılmayacaktır.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu araştırmaya genetik/biyolojik incelemeler yapılmak üzere kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı ve kan örneği vermeyi kabul ediyorum.

Gönüllünün
Adı-Soyadı:

İmzası:

Vesayet altında bulunanlar için vasisinin:
Adı-Soyadı:

İmzası:

Açıklamaları yapan/örneği alan araştırmacının:
Adı-Soyadı:

İmzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin
Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih:/...../.....

