

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**MÜLLERYAN APLAZİLİ TÜRK OLGULARDA
ADAY GEN HARİTALAMA ÇALIŞMALARI**

Durkadın DEMİR EKŞİ

Doktora Tezi

Antalya, 2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

MÜLLERYAN APLAZİLİ TÜRK OLGULARDA ADAY GEN HARİTALAMA ÇALIŞMALARI

Durkadın DEMİR EKŞİ

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Özgül ALPER**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2012.03.0122.001)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir.”

Antalya, 2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayın ve diğer yayınlar aşağıdadır.

1. Quaynor SD, Ko EK, Chorch LP, Sullivan ME, **Demir D**, Waller JL, Kim HG, Cameron RS, Layman LC. NELF knockout is associated with impaired pubertal development and subfertility. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 May 15;407:26-36. doi: 10.1016/j.mce.2015.02.015.
2. Erman Akar M, Ozekinci M, Alper O, **Demir D**, Cevikol C, Meric Bilekdemir A, Daloglu A, Ongut G, Senol Y, Ozdem S, Uzun G, Luleci G, Suleymanlar G. Assessment of women who applied for the uterine transplant project as potential candidates for uterus transplantation. *J Obstet Gynaecol Res.* 2015 Jan;41:12-6. doi: 10.1111/jog.12486.
3. **Demir D**, Türk kahraman D, Aktaş Samur A, Luleci G, Akçurin S, Alper ÖM. Mitochondrial ATPase Subunit 6 and Cytochrome B Gene Variations in Obese Turkish Children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2014 Dec 5;6(4):209-15. doi: 10.4274/Jcrpe.1601.
4. Nur BG, Pehlivanoglu S, Mihci E, Caliskan M, **Demir D**, Alper OM, Kayserili H, Luleci G. Clinicogenetic Study of Turkish Patients With Syndromic Craniosynostosis and Literature Review. *Pediatr Neurol.* 2014 May;50(5):482-90. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2014.01.023.
5. Quaynor SD, Goldberg LY, Ko EK, Stanley RK, **Demir D**, Kim HG, Chorch LP, Cameron RS, Layman LC. Differential expression of nasal embryonic LHRH factor (NELF) variants in immortalized GnRH neuronal cell lines. *Mol Cell Endocrinol.* 2014 Mar 5;383(1-2):32-7. doi: 10.1016/j.mce.2013.11.020.
6. Akin Y, **Demir D**, Gorgisen G, Luleci G, Alper OM, Watanabe CS, Sahiner IF, Usta MF. Novel and rare CFTR gene mutations in Turkish patients with congenital aplasia of vas deferens. *Andrologia.* 2014 Mar;46:198-9. doi: 10.1111/and.12053.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼'ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda
Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 07/09/2015

Tez Danışmanı : Prof. Dr. ¼zg¼l ALPER
Akdeniz ¼niversitesi
Tıp Fak¼ltesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

¼ye : Prof. Dr. M¼nire ERMAN AKAR
Akdeniz ¼niversitesi
Tıp Fak¼ltesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

¼ye : Prof. Dr. Osman Nidai ¼ZEř
Akdeniz ¼niversitesi
Tıp Fak¼ltesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

¼ye : Prof. Dr. G¼lseren BAęCI
Pamukkale ¼niversitesi
Tıp Fak¼ltesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

¼ye : Prof. Dr. Sibel BERKER KARA¼Z¼M
Akdeniz ¼niversitesi
Tıp Fak¼ltesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Onay:

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından
uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/..... tarih ve/.... sayılı
kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN
Enstit¼ M¼d¼r¼

ÖZET

Mülleryan Aplazi (MA), diğer adlarıyla Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) Sendromu, Konjenital Uterus ve Vajina Yokluğu (CAUV; OMIM 277000); fallop tüpleri, uterus ve vajinanın üst 2/3'ünün konjenital aplazisi ile karakterize bir hastalıktır. İzole tip olan tip 1 ve renal, kardiyak, iskelet ya da işitme anomalilerinin eşlik ettiği tip 2 Mülleryan aplazi olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. MA'nın insidansı, kadınlarda 1/4500 olarak belirlenmiştir. Poligenik ve multifaktöryal olduğu düşünülen hastalıkla ilgili aday gen çalışmaları sonuçları, henüz hastalığın genetik etiyolojisini tanımlamak için yeterli değildir. Kopya sayısı varyasyonları (CNV) olarak tanımlanan genomik mikrolezyon ve mikroduplikasyonların belirlenmesi, hastalıkla ilişkili yeni aday genlerin belirlenmesi açısından son derece önemlidir. Çalışmamıza Mülleryan aplazi tanılı 66 olgu dahil edilmiştir. Olguların konvansiyonel sitogenetik analizi sonucu, hastalık etkeni olabilecek bir kromozomal abnormalite saptanmamıştır. 19 hastanın genomik DNA'sı, Affymetrix Cytoscan HD mikrodizin platformu ile CNV açısından taranmıştır. Dört hastada 1p31.1, 13p14.11 bölgelerinde mikroduplikasyon, 16p11.2, 16p13.3, Xq25 bölgelerinde mikrolezyon saptanmıştır. CNV saptanan hastaların tamamı tip 1 Mülleryan aplazi tanılıdır. Hastalıkla ilişkili olabilecek resesif varyasyon bölgelerinin belirlenmesi için homozigosite analizi yapılmıştır ancak, ortak bir homozigot bölge tespit edilememiştir. CNV çalışmalarının yanı sıra, hastalıkla bugüne kadar en iyi ilişkilendirilen Wingless-type MMTV integration site family, member 4 (*WNT4*, NM_030761.4) geni ve belirlenen olası aday genlerin dizi analizi çalışmaları yapılmıştır. Toplamda 12 genin tüm ekzonları ve ekzona yakın intronik bölgelerin dizi analizinin yapıldığı çalışmamızda, Hepatosit Nüklear Faktör 1 beta (*HNF1B*, NM_000458.2) geni intron 2 bölgesinde c.545-49_50insTGTC (n=5), intron 8 bölgesinde c.1535+47_48insC (n=5) ve LIM Homeobox 1 (*LHX1*, NM_005568.3) ekzon 5 bölgesinde c.1162G>T (p.Ala388Ser) (n=5) varyasyonları saptanmıştır. Aile bireylerinin ilgili varyasyonlar açısından taranması ile, saptanan varyasyonların ailesel geçiş gösterdiği bulunmuştur. Ek olarak, *LHX1* geninde saptanan p.Ala388Ser varyasyonunun, SIFT analizi aracılığıyla protein fonksiyonu üzerine etkisi, "tolere edilebilir" olarak bulunmuştur. Ayrıca, Family with Sequence Similarity 190, Member A (*FAM190A/KIAA1680*, NM_001145065.1) ve Katenin Alfa 3 (*CTNNA3*, NM_013266) genlerinde, sırasıyla c.2117A>G (p.Lys706Arg) (n=1), c.1732+13C>T (n=1) varyasyonları saptanmıştır ancak varyasyonların doğrulanması gerekmektedir. Mülleryan aplaziden sorumlu gen ya da genlerin bulunması ile ilgili çalışmamız devam etmektedir. Daha çok sayıda Mülleryan aplazili bireyde yapılacak CNV analizi, homozigosite haritalaması ve olası aday genlerin dizi analizi, hastalığın moleküler temellerinin aydınlatılması açısından önem kazanmaktadır. Elde edilecek bulgular, konjenital kadın üreme sistemi anomalilerinin tanı ve tedavisine yardımcı olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Mülleryan aplazi, CNV, Aday gen, Dizi analizi

ABSTRACT

Müllerian Aplasia, in other words Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome or Congenital Absence of Uterus and Vagina (CAUV; OMIM 277000) is characterised by congenital agenesis of uterus, cervix and upper two-thirds of the vagina which is the second most common cause of primary amenorrhea. Müllerian aplasia is classified in two groups; type 1 is isolated form, type 2 is syndromic form accompanied by renal, cardiac, skeletal and hearing anomalies. The incidence of the disease is determined as 1/4500. Candidate gene analysis studies are still insufficient to reveal genetic etiology of Müllerian aplasia which is thought to be polygenic and multifactorial. Detection of copy number variations (CNVs) including genomic microduplications and microdeletions is extremely important in terms of determining new candidate genes related to the disease. In our study, 66 patients who were diagnosed with Müllerian aplasia were included. There is no chromosomal abnormality which may contribute to the disease. Genomic DNA of 19 patients were screened for revealing CNVs by Affymetrix Cytoscan HD microarray platform. Microduplications at 1p31.1, 13p14.11 and microdeletions at 16p11.2, 16p13.3, Xq25 were detected in four patients who were diagnosed with type 1 Müllerian aplasia. Homozygosity analysis was performed to reveal genomic regions that have susceptibility for recessive variations. But, there is no common region detected. Wingless-type MMTV integration site family, member 4 (*WNT4*, NM_030761.4) is the only well-characterized causative gene for Müllerian aplasia. Sequence analysis of exonic and intronic regions close to exon boundaries of *WNT4* and possible candidate genes (total number of 12 genes) was performed. Variations of c.545-49_50insTGTC (n=5) in the intron 2, c.1535+47_48insC (n=5) in the intron 8 of the Hepatocyte Nuclear Factor 1 beta (*HNF1B*, NM_000458.3) gene and c.1162G>T (p.Ala388Ser) (n=5) in the exon 5 of the LIM Homeobox 1 (*LHX1*, NM_005568.4) gene were detected. Familial transmission of the detected variations has been found by screening the family members. In addition, effect of the p.Ala388Ser variation in the *LHX1* gene on protein function was predicted "tolerable" by SIFT analysis. c.2117A>G (p.Lys706Arg) (n=1) and c.1732+13C>T (n=1) variations were detected respectively in the Family with Sequence Similarity 190, Member A (*FAM190A/KIAA1680*, NM_001145065.1) and Catenin Alpha 3 (*CTNNA3*, NM_013266) genes also, but these variations need to be confirmed. Our study on identification the gene or genes related to the Müllerian aplasia is still going on. Performing CNV analysis, homozygosity mapping and sequence analysis of possible candidate genes in a larger group of individuals with Müllerian aplasia is important for the elucidation of the molecular basis of the disease. Final data may help in the diagnosis and treatment of congenital female reproductive system anomalies.

Key Words: Mullerian aplasia, CNV, Candidate gene, Sequencing analysis

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı gerçekleştirmek için her türlü imkanı sağlayan, bilimsel düşünce sisteminin evrensel ilkelerini bilim etiği çerçevesinde öğreterek rehberlik eden değerli danışman hocam Prof. Dr. Özgül ALPER'e

Çalışmada yer alan olguların seçimi, örneklerin ve klinik verilerin teminini sağlayan sayın Prof. Dr. Münire ERMAN AKAR'a

Sitogenetik analiz verilerini değerlendiren sayın hocam Prof. Dr. Güven LÜLECİ'ye,

Tez çalışması sürecinde destek olan sayın Doç. Dr. Özlenen ÖZKAN ve sayın Prof. Dr. Ömer ÖZKAN'a

Tez çalışmamı gerçekleştirmem için laboratuvar olanaklarını sunan, kıymetli deneyimlerini paylaşan Amerika Birleşik Devletleri Georgia Tıp Fakültesi'nden sayın Prof. Dr. Lawrence C. LAYMAN, Harvard Üniversitesi'nden sayın Prof. Dr. Yiping SHEN ve teknisyenlerine,

Yurtdışında bulunduğum süre zarfında destek ve yardımları için sevgili arkadaşım Elanur YILMAZ'a,

Akdeniz Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki sayın hocalarım, araştırma görevlisi, teknisyen arkadaşlarım ve sekreterlerimize,

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Doktora eğitimim süresince manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman hedefi göstererek cesaretlendiren değerli öğretmenim Fatma KÖK'e

Tükenmeyen sevgi, sabır ve her türlü desteklerinden dolayı, bugüne gelmemde çok en büyük paya sahip, beni yetiştiren başta annem Havana DEMİR olmak üzere Ailem'e

Son olarak; sonsuz sevgi ve sabırla karşılaştığım zorlukları kolaylaştıran, motive eden, her daim destek olduğunu bildiğim değerli eşim Yunus Emre EKŞİ'ye içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Dişi Genital Sistem Anatomisi	4
2.2. Dişi Genital Sisteminin Embriyolojik Gelişimi	5
2.3. Konjenital Dişi Genital Sistem Anomalileri ve Sınıflandırılması	8
2.4. Mülleryan Aplazi	10
2.4.1. Mülleryan Aplazinin Klinik Özellikleri	10
2.4.2. Mülleryan Aplazinin Genetik Temeli	11
2.4.2.1. Mülleryan Aplazili Olgularda Belirlenen Kromozomal Aberasyonlar	11
2.4.2.2. Mülleryan Aplazinin Genetik Temelini Aydınlatmada Kopya Sayısı Varyasyonları Analizi	11
2.4.2.3. Mülleryan Aplazinin Genetik Temelinin Aydınlatılmasında Aday Gen Yaklaşımı	15
BİREYLER VE YÖNTEMLER	22
3.1. Mülleryan Aplazi Tanısı Almış Olgularda Klinik İnceleme	22
3.2. Periferel Kan ve Tükürük Örneklerinin Alımı	22
3.3. Periferel Kandan Genomik DNA Eldesi	23
3.3.1. Kullanılan Solüsyonlar	23
3.3.2. İşlemler	24

3.4.	Tükürük Örneğinden Genomik DNA Eldesi	24
3.4.1.	Kullanılan Solüsyonlar	24
3.4.2.	İşlemler	25
3.5.	DNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü	25
3.6.	Periferal Kandan Kromozom Eldesi ve Analizi	25
3.6.1.	Lenfosit Kültürü İçin Kullanılan Besi Ortamının Hazırlanması	25
3.6.2.	Ekim	26
3.6.3.	Metafazların Elde Edilmesi (Harvest)	26
3.6.4.	Yayma	26
3.6.5.	GTG (G banding by Tripsin using Giemsa) Bantlama	26
3.6.6.	Analiz	27
3.6.7.	CBG Bantlama	27
3.6.8.	NOR Bantlama	28
3.7.	Kopya Sayısı Varyasyonları (CNV) Analizi	28
3.7.1.	Enzimatik Kesim	28
3.7.2.	Ligasyon	29
3.7.3.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Amplifikasyonu	29
3.7.4.	PZR Ürünü Kontrolü	30
3.7.5.	PZR Ürünü Pürifikasyonu	30
3.7.6.	Pürifikasyon Ürünü Miktar Tayini	30
3.7.7.	Fragmentasyon	31
3.7.8.	Fragmente Edilen Örneklerin Jel Kontrolü	31
3.7.9.	İşaretleme	31
3.7.10.	Hibridizasyon	32
3.7.11.	Yıkama, Boyama, Tarama	32
3.7.12.	Analiz	33
3.8.	Heterozigosite Kaybı (Loss of Heterozogosity/LOH) Analizi	33
3.9.	Olası Aday Genlerin Belirlenmesi	34
3.10.	Aday Genlerin Dizi Analizi	35

3.10.1.	Primer Dizaynı	35
3.10.2.	Olası Aday Genlerin PZR Amplifikasyonu	35
3.10.3.	PZR Reaksiyonu İçeriği	35
3.10.4.	PZR Ürünlerinin AgaroZ Jel Elektroforezi ile Kontrolü	36
3.10.5.	PZR Ürünlerinin Saflaştırılması	36
3.10.6.	DNA Dizi Analizi	36
3.10.6.1.	Dizileme Reaksiyonu	36
3.10.6.2.	Dizileme PZR Programı	36
3.10.6.3.	Dizi Analizi Yapılacak Ampikonların Saflaştırılması	36
3.11.	İn-Siliko Analiz	37
BULGULAR		38
4.1.	Klinik Bulgular	38
4.2.	Sitogenetik Bulgular	41
4.3.	Genomik DNA Örneklerinin Hazırlanması ve Kopya Sayısı Varyasyonları Bulguları	41
4.4.	LOH/Homozigosite Bulguları	54
4.5.	Dizi Analizi ile Olası Aday Genlerde Belirlenen Varyasyonlar	56
4.6.	Saptanan Varyasyonların Aile Bireylerinde Taranması	59
4.7.	İn-Siliko Analiz Verileri	61
TARTIŞMA		62
SONUÇLAR		72
KAYNAKLAR		73
EKLER		85
Ek-1.	Hasta Klinik Değerlendirme Formu	86
ÖZGEÇMİŞ		87

SİMGELER VE KISALTMALAR

MA	:	Mülleryan Aplazi
MRKH	:	Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Sendromu
CAUV	:	Konjenital Uterus ve Vajina Yokluğu/Congenital Absence of Uterus and Vagina
CNV	:	Kopya Sayısı Varyasyonu/Copy Number Variation
CGH	:	Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon/Comparative Genomic Hybridization
ASRM	:	Amerikan Üreme Tıbbı Derneği/American Society for Reproductive Medicine
USG	:	Ultrasonografi
IVP	:	İntravenöz Pyelografi
FSH	:	Folikül Stimüle Edici Hormon
LH	:	Lüteinizan Hormon
E2	:	Östradiol
PRL	:	Prolaktin
TSH	:	Tiroid Stimüle Edici Hormon
GTG	:	G Bantlama/G Banding by Trypsin Using Giemsa
CBG	:	C-Bands by Barium Hydroxide Using Giemsa
NOR	:	NOR Bantlama/Nucleolar Organising Regions
TdT	:	Terminal Deoksi Nükleotil Transferaz
DGV	:	Genomik Varyantlar Veritabanı/Database of Genomic Variants
SNP	:	Tek Nükleotid Polimorfizmi/Single Nucleotide Polymorphism
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
AMH	:	Anti-mülleryan Hormon
AMHR	:	Anti-mülleryan Hormon Reseptörü
bç	:	Baz çifti
Kb	:	Kilobaz
Mb	:	Megabaz

Hg18/19	:	Human Genome 18/19 versiyon referans DNA dizisi
WNT4	:	Wingless-type MMTV Integration Site Family, Member 4
HNF1B	:	Hepatosit Nüklear Faktör 1 Beta
LHX1	:	LIM Homeobox Protein 1
CTNNA3	:	Katenin Alfa 3
FAM190A	:	Family with Sequence Similarity 190, Member A (KIAA1680)
CNOT10	:	CCR4-NOT Transkripsiyon Kompleksi-Subünite 10
TRIM71	:	Tripartite Motif Containing 71, E3 Ubiquitin Protein Ligaz
ZNF200	:	Çinko Parmak Protein 200
ZNF213	:	Çinko Parmak Protein 213
OR1F1	:	Olfaktör reseptör, Aile 1, Altaile F, Üye 1
LRRTM3	:	Leucine Rich Repeat Transmembrane Neuronal 3
CHSY3	:	Kondroitin Sülfat Sentaz 3
KIF22	:	Kinezin Ailesi Üyesi 22
TAOK2	:	TAO Kinaz 2
TBX6	:	T Box 6
DGGE	:	Denatüre Edici Gradyent Jel Elektroforezi
DHPLC	:	Denatüre Edici Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
MLPA	:	Multipleks Ligasyona-dayalı Prob Amplifikasyon
TSPY1	:	Y ilişkili Testis Spesifik Protein 1
ICR1	:	İmprinting Kontrol Bölgesi
HOX	:	Homeobox
MUC1	:	Mucin 1, Cell Surface Associated
JAG1	:	Jagged 1
DLL1	:	Delta-like 1
MMP14	:	Matriks Metalloproteinaz 14
LRP10	:	Lipoprotein Reseptör-İlişkili Protein 10
PI3K	:	Fosfoinozitol 3 Kinaz
RT-qPCR	:	Real Time-Kantitatif PZR

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Dişi internal genitalyanın şematik gösterimi	5
2.2. Beş haftalık emriyoda primordial germ hücrelerinin göçü	6
2.3. Yedi haftalık embriyoda seksüel gelişimin farklanmamış döneminde görülen kanallar	7
2.4. ASRM'ye göre konjenital dişi genital sistem anomalilerinin sınıflandırılması	9
3.1. Örneğin çipe yüklenmesi	32
4.1. Adaptör takılan fragmanların PZR amplifikasyonu sonucu agaroz jel görüntülemesi	42
4.2. Fragmentede edilen PZR ürünlerinin agaroz jel görüntülemesi	43
4.3. MA-56 numaralı olguda saptanan heterozigot 1p31.1 duplikasyonu	51
4.4. MA-29 numaralı olguda saptanan heterozigot 13q14.11 duplikasyonu	51
4.5. MA-22 numaralı olguda saptanan heterozigot 16p11.2 delesyonu	52
4.6. MA-23 numaralı olguda saptanan heterozigot 16p13.3 delesyonu	52
4.7. MA-22 numaralı olguda saptanan heterozigot Xq25 delesyonu	53
4.8. Literatürde Mülleryan aplazili olgularda tanımlanmış 16p11.2 mikrolelesyonu bölgeleri	54
4.9. MA-37 nolu olguya ait homozigosite verileri	55
4.10. MA-53 nolu olguya ait homozigosite verileri	55
4.11. <i>HNF1B</i> geninde saptanan c.545-49_50insTGTC varyasyonu elektroforegramları	58
4.12. <i>HNF1B</i> geninde saptanan c.1535+47_48insC varyasyonu elektroforegramları	59
4.13. <i>LHX1</i> geninde saptanan c.1162G>T (p.Ala388Ser) varyasyonu elektroforegramları	59
4.14. <i>LHX1</i> geninde belirlenen c.1162G>T (p.Ala388Ser) varyasyonuna ait SIFT analizi verileri	61

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Akrabalık derecesi tahmini için homozigosite oranları	34
4.1. Mülleryan aplazili olguların klinik ve sitogenetik bulguları	39
4.2. MA-09 nolu olguda saptanan CNV'ler	44
4.3. MA-22 nolu olguda saptanan CNV'ler	44
4.4. MA-23 nolu olguda saptanan CNV'ler	44
4.5. MA-24 nolu olguda saptanan CNV'ler	45
4.6. MA-25 nolu olguda saptanan CNV'ler	45
4.7. MA-26 nolu olguda saptanan CNV'ler	45
4.8. MA-27 nolu olguda saptanan CNV'ler	46
4.9. MA-29 nolu olguda saptanan CNV'ler	46
4.10. MA-30 nolu olguda saptanan CNV'ler	46
4.11. MA-31 nolu olguda saptanan CNV'ler	47
4.12. MA-34 nolu olguda saptanan CNV'ler	47
4.13. MA-37 nolu olguda saptanan CNV'ler	47
4.14. MA-45 nolu olguda saptanan CNV'ler	48
4.15. MA-53 nolu olguda saptanan CNV'ler	48
4.16. MA-56 nolu olguda saptanan CNV'ler	48
4.17. MA-58 nolu olguda saptanan CNV'ler	48
4.18. MA-61 nolu olguda saptanan CNV'ler	49
4.19. MA-62 nolu olguda saptanan CNV'ler	49
4.20. MA-66 nolu olguda saptanan CNV'ler	49
4.21. Mülleryan aplazili dört olguda saptanan yüksek olasılıklı patolojik CNV'ler	50
4.22. Olguların % Otozomal LOH verileri (F_{ROH}) ve buna bağlı akrabalık dereceleri	56

4.23.	Dizi analizi yapılan olası aday genler	57
4.24.	Dizi analizi bulguları	58
4.25.	Hasta olguların <i>HNF1B</i> geninde saptanan c.545-49_50insTGTC varyasyonunun aile bireylerindeki durumu	60
4.26.	Hasta olguların <i>HNF1B</i> geninde saptanan c.1535+47_48insC varyasyonunun aile bireylerindeki durumu	60
4.27.	Hasta olguların <i>LHX1</i> geninde saptanan c.1162G>T (p.Ala388Ser) varyasyonunun aile bireylerindeki durumu	61

GİRİŞ

İnsanlarda yaşamın idame ettirilmesi için gerekli olan sistemlerden biri, üreme sistemidir. Diğer organ sistemleri gibi, üreme sisteminin embriyonal dönemde gelişimi iyi organize biyolojik mekanizmalar ile gerçekleşmektedir. Bu organizasyondaki aksamalar başta infertilite olmak üzere, ölümle sonuçlanan komplikasyonlara sebebiyet verebilmektedir (1). Genital sistemin embriyonal dönemde gelişim bozukluklarıyla ortaya çıkan Mülleryan kanal anomalileri, üreme potansiyelini düşürmekte ya da tamamen ortadan kaldırmaktadır. Mülleryan kanalın hiç oluşmaması ile karakterize olan Mülleryan aplazide üreme potansiyeli kaybolur. Bu hastalıktan etkilenmiş bireylerin ovumları in vitro fertilizasyon ile döllenip, taşıyıcı bireylere implante edilmesiyle, hasta bireylerin çocuk sahibi olmaları sağlanır (2). Ülkemizde ilk defa Ağustos 2011 yılında, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde uterus transplantasyonu yapılmış, bireyin gebe kalma çalışmaları halen devam etmektedir. Dişi popülasyonda, konjenital üreme sistemi malformasyonlarının insidansı %1-5 olmasına karşın fertil bireylerde bu oran %6.5'e çıkmaktadır (3). Dişi genital malformasyonlarından olan Mülleryan aplaziler, dişi bireylerde fertilite ve menstruasyon anomalilerine sebep olan iç genital yapıdaki gelişimsel bozukluklardır (4, 5). Amerikan Tıbbi Üreme Derneği'nin (ASRM) sınıflandırma sistemine göre dişi genital malformasyonlar yedi grupta değerlendirilmektedir. Total ya da kısmi olarak Mülleryan kanalların agenezi ile karakterize Mülleryan aplazi, sınıf I grubunda yer almaktadır (6).

Mülleryan aplazi, Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) Sendromu (OMIM#277000) ya da Konjenital Uterus ve Vajina Yokluğu (Congenital Absence of Uterus and Vagina / CAUV) olarak da adlandırılmaktadır. Fallop tüpleri, uterus ve üst vajinanın 2/3'ünün konjenital aplazisi ile karakterize bir hastalıktır. Dış genital yapı normal dişi görünümündedir. Hastalıktan etkilenmiş bireylerin, sitogenetik bulguları normal dişi karyotipinde, adölesan dönemlerinde sekonder seks karakter gelişimleri ve over işlevleri normaldir. Nadir gözlenen bu hastalığın insidansı, 4500 doğumda 1'dir (7). Olgular çoğunlukla adölesan dönemde primer amenore şikayeti ile kliniğe başvurmaktadır. Primer amenorenin, gonadal disgenezisden sonra görülen, ikinci en sık nedenidir.

Çalışmamızda genetik kökeni henüz tam olarak aydınlatılamamış Mülleryan aplazinin gelişiminden sorumlu olabilecek aday genlerin tanımlanması amaçlanmıştır. Genomik çalışmaların hızla devam ettiği bu dönemde araştırma projemiz, uterus ve vajinanın gelişimsel abnormalitelerinin moleküler patogenezinin aydınlatılmasına önemli katkı sağlamaktadır. İlgili genlerin tanımlanması, klinik tanı ile beraber, genetik

risklerin ve genetik heterojenliğin daha iyi değerlendirilmesine, genotip-fenotip ilişkisinin anlaşılmasına ve yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine yol açma potansiyeli açısından oldukça önemlidir.

Genel olarak bakıldığında, 2001 yılından bu yana Mülleryan aplazili bireyler üzerinde sınırlı sayıda genetik çalışma yapılmış ve halen hastalıkla ilişkili olabilecek gen ya da genomik bölgeler aydınlatılamamıştır. Bilindiği gibi, hastalıklardan sorumlu genlerin tanımlanması, hastalıkların patofizyolojisinin aydınlatılması ve normal insan gelişim biyolojisi ile ilgili bilinmeyenlerin açığa çıkarılması açısından son derece önemlidir.

Araştırma projemizde test ettiğimiz hipotez, Mülleryan aplazinin moleküler patogenezinin sorumlu olan gen ya da genlerin, hastalıktan etkilenmiş olgularda tespit edilebilecek, dengeli/dengesiz kromozomal yeniden düzenlenmelerle sonuçlanan kromozomal kırık noktalarında ve kopya sayısı varyasyonlarının (mikrodelesyon ve mikroduplikasyon) belirlendiği genomik bölgelerde lokalize olduğudur. Projemiz kapsamındaki olgulara ilk yaklaşımımız kromozomal abnormalite varlığının sorgulanmasıdır. Bu nedenle bütün olguların periferik kan örnekleri alınarak, konvansiyonel yöntem ile sitogenetik analizleri yapılmıştır. Kromozomal abnormaliteler, hastalıkların genetik kökeninin aydınlatılması açısından oldukça önemlidir. Kromozomal kırıklar, delesyon ya da duplikasyon etkisi ile gen dozaj değişimine, monoallelik delesyon ile komplementer DNA dizisindeki resesif mutasyonların patolojik etki göstermesine, gen füzyonu ile kimerik genlerin oluşumuna ve gen regülatör elementlerin bozulması ile gen ekspresyon düzeyinin değişimine yol açarak hastalık fenotipine yol açabilmektedir (8). Dolayısıyla kırık noktalarındaki genler, hastalıkla ilişkili aday genler olabilme potansiyelini taşımaktadır. Kromozomal aberasyonun belirlenmesini takiben bu genlerin pozisyonel klonlanması ve haritalanması gerekmektedir. Aynı fenotipte, kromozomal olarak normal hastalarda bu yolla genlerin detaylı incelenmesi ile gen-hastalık ilişkisinin kurulması mümkün olabilecektir. Projemizde, ikinci yaklaşımımız, sitogenetik abnormalite saptanmayan olgularda, submikroskopik Kopya Sayısı Varyasyonlarının (CNV) belirlenmesi olmuştur. Elde edilen CNV verileri güncellenmiş veritabanları ile karşılaştırılmıştır. Mülleryan gelişimde rol alabilecek genleri içeren aday genomik bölgeler saptanmıştır.

Ülkemizde CNV değerlendirmelerine yönelik çalışmalara yeni başlanmıştır. Üniversitemiz bünyesinde çipe dayalı Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH) ya da mikrodizin teknolojisi mevcut değildir. Bu ve devamındaki aşamalar, Amerika Birleşik Devletleri, Georgia Tıp Fakültesi'nde Prof. Dr. Lawrence Layman'ın laboratuvarında gerçekleştirilerek, gerekli deneyim kazanılmıştır. CNV verileri ile saptanan olası aday genler, PZR tekniğine dayalı DNA dizi analizine alınmış ve *HNF1B* ve *LHX1* genlerinde varyasyonlar saptanmıştır. Bu varyasyonlar sağlıklı aile bireylerinde test edilmiş ve varyasyonların ailesel geçişi değerlendirilmiştir. Mülleryan

Aplaziden sorumlu gen ya da genlerin bulunması ile ilgili çalışmamız halen devam etmektedir.

Bilindiği gibi, insan genom projesinin hem kuramsal hem de uygulamalı tıbbı önemli getirisi olmuştur. Bugüne değin yapılmış olan sınırlı sayıdaki yayınlanmış çalışmalardan anlaşılıyor ki; konjenital vajina ve uterusu olmayan olgularda aday olabilecek genlerin netlik kazanmamış olması gen haritalama çalışmalarının önemini ortaya koymaktadır. Aday gen yaklaşım stratejilerine dayalı projemizden elde edilecek özgün veriler, dişi bireylerdeki konjenital genital abnormalitelerin moleküler patogenezinde rol oynayabilecek yeni aday genlerin ya da genomik bölgelerin saptanmasına yardımcı olacaktır. İlgili genlerin tanımlanması ile kesin tanı, genetik risklerin daha iyi değerlendirilmesine ve tedavilerin geliştirilmesine yol açması açısından oldukça önemlidir.

Ülkemizde gerek genetik açıdan, gerekse klinik açısından bu değerli nadir görülen olgular üzerinde hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Araştırma projemiz doğuştan genital abnormalitelerin genetiği üzerine dayalı özgün bir tez olup bu alanda ülkemizde yapılmakta olan ilk çalışmadır.

GENEL BİLGİLER

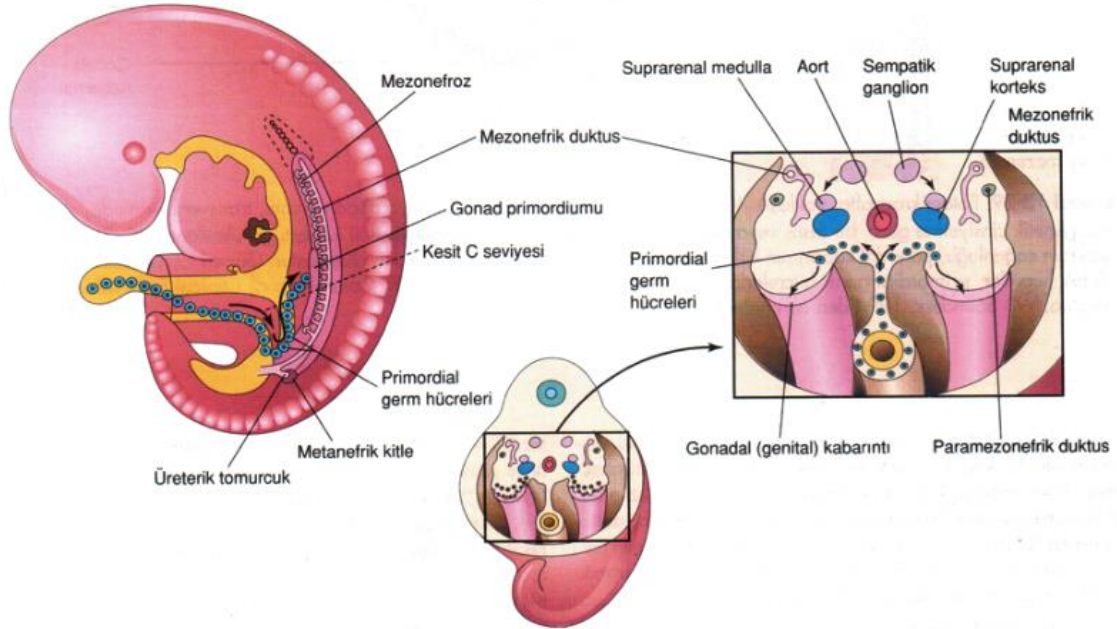
2.1. Dişi Genital Sistem Anatomisi

Dişi üreme kanalı organları, eksternal ve internal genitalya olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Eksternal genital organlar; perineal alanda bulunur ve mons pubis, klitoris, üretra ağzı, labia major (büyük dudaklar), labia minor (küçük dudaklar), vestibül, Bartolin bezleri ve periüretral bezlerden oluşmaktadır. Eksternal genital organları kısaca tanımlamak gerekirse; vulva ya da pudendum, perineal alanda görülen eksternal genital organların tamamını içeren bölge olarak ifade edilmektedir. Mons Pubis, puberteden sonra kıllanmanın görüldüğü, deri altı yağ dokusu bulunduran yuvarlak tepedir. Labia major, yağ ve fibröz dokuyu içeren, uzunlamasına iki büyük deri katlantıdır. Labia minor ise, vajinal açıklık ve labia major arasında yer alan küçük, kırmızı deri katlantıdır. Himen, vajinanın girişinde yer alan ince, çoğunlukla delikli bir membrandır. Klitoris; vestibülün üst kısmında, kısa, silindirik, erektile bir organdır. Vestibül, embriyonik ürogenital sinüsün en aşağı bölümüdür. Küçük dudaklar birbirlerinden ayrılarak tutulduğu zaman arada görülen yarıktır. Vestibül birçok müsinöz salgı bezi içermektedir. Üretra, mesaneden vestibüle çıkan, membranöz bir idrar atım kanalıdır. En büyük paraüretral bezler olan Skene bezleri, üretranın distaline komşu, dallanmış, tübüler bezlerdir. Bartolin Bezleri ise vajinal deliğin sağında ve solunda yer alan bezlerdir. Vestibüler bulbuslar vajinal açıklığın her iki tarafındaki erektile dokudur (Şekil 2.1).

İnternal genital organlar, pelvisin içinde lokalize olurlar ve vajina, uterus, serviks, Fallop tüpleri, overler ve bunları çevreleyen, destekleyen yapıları içerirler (Şekil 2.1). Vajina, vulvadaki vestibülden uterusu kadar uzanan, ince duvarlı, gerilebilir fibromüsküler tüptür. Döllenme sırasında, spermin uterusu geçişini sağlayan bir yol olarak görev alır. Duvarı anteroposterior eksende basıktır ve enine kesitinde “H” harfi şeklinde görünüme sahiptir. Vajinanın üst kısmına serviks uzanır. Uterusun alt kısmındaki dar bölüm serviks olarak isimlendirilmektedir. Uterusun müsküler yapısının tersine serviks büyük oranda fibröz dokudan oluşmaktadır. Uterus ise, dişi pelvisinin merkezinde lokalize, kalın duvarlı, içi boşluklu, müsküler bir organdır. Embriyonun iç duvarına tutunduğu ve doğuma kadar içerisinde büyümeyi gerçekleştirdiği yapıdır. Tuba uterinalar, uterusun üst yan taraflarından uterusu açılmaktadırlar. Bir çift olarak bulunan uterin tüpler, ovidukt ya da fallop tüpleri olarak da isimlendirilmektedir. Tüpler 10-14 cm uzunluğundadır. Bu bölgede fertilizasyon gerçekleşir. “Fimbria” olarak isimlendirilen 20-25 tane düzensiz parmak benzeri yapı, tüplerin uç kısmını çevrelemektedir. “Fimbria ovarika” olarak adlandırılan fimbriaların en büyüğü overe

kromozomlarına sahip ise, farkanmamış gonadın korteksi overe farklılaşırken, medullası geriler. Embriyo XY kromozomlarına sahip ise, medulla testise farklılaşır, korteksten geriye sadece bir takım kalıntılar kalır. Y kromozomu tarafından kodlanan testis belirleyici faktör (TDF), testiküler farklılaşmayı sağlamaktadır. TDF varlığında primer seks kordonları seminifer tübüllere farklılaşırlar. Seminifer tübüllerin ilk taslakları, derin kısımlarında rete testisi oluşturmak üzere dallanırlar. Yedinci hafta sonunda bağ dokusundan tunika albuginea gelişir ve bundan da septula testisler oluşur. Sekizinci haftada mezenşimden gelişen Leydig hücreleri testosteron salgılamaya başlar. Testosteron erkek genital sisteminin tamamen yapılaşmasını sağlar.

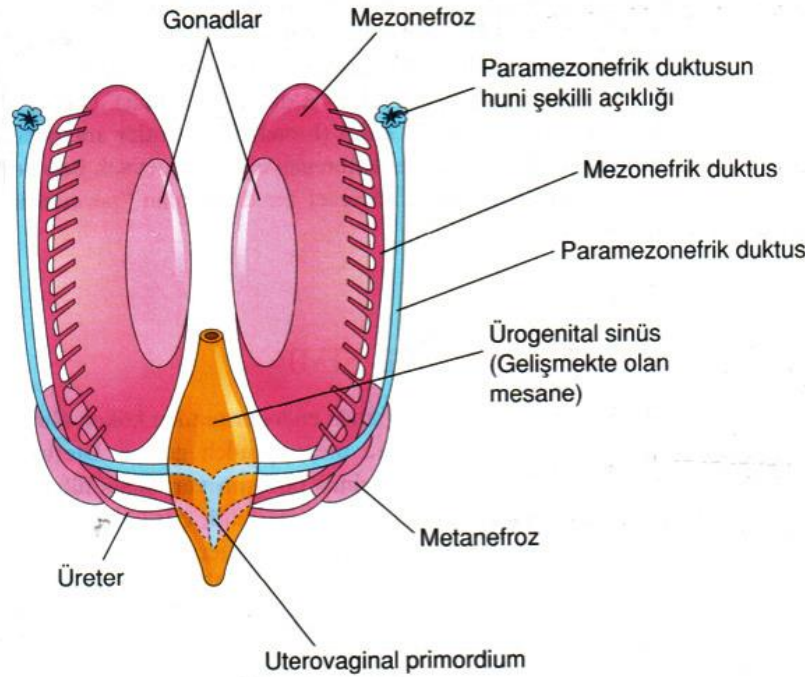
Dişilerde primer seksüel farklılaşma, hormonlara bağlı değildir. Y kromozomu yokluğunda, farkanmamış gonad dişi yönünde gelişim gösterir. Dişi embriyolarda genital gelişim daha yavaş ilerler. 10. haftaya kadar overler histolojik olarak ayırt edilemezler. Primer seks kordonları (kortikal kordonlar) medulla içerisine doğru sokulurlar ve rudimenter bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar. Kortikal kordonlar, fetal overin yüzey epitelinden köken alarak, mezenşim içerisine doğru ilerler. Boyutları artan kortikal kordonların içerisine, primordial germ hücreleri girer. Primordial germ hücreleri, primitif seks hücreleri olup, dördüncü haftada yolk kesesi duvarında, allantoisin başlangıç yerine yakın, endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Embriyonun katlanması sırasında gonadal kabartılara göç ederler (Şekil 2.2). Yaklaşık olarak 16. haftada, kortikal kordonlar izole hücre kümelerine parçalanarak primordial folikülleri oluştururlar. Her bir folikül, primordial germ hücrelerinden köken alan bir oogonium içerir. Fötal oogoniumlar mitoz bölünme geçirerek, binlerce primordial folikül oluşur. Postnatal dönemde yeni oogoniumlar oluşmaz.



Şekil 2.2. Beş haftalık embriyoda primordial germ hücrelerinin göçü (11)

5-7. haftalarda genital sistem farklanmamış safhada iken embriyolarda bir çift kanal bulunmaktadır (Şekil 2.3). Mezonefrik duktus (Wolf kanalı) erkek üreme sisteminin gelişiminde etkin iken, paramezonefrik duktus (Müller kanalı) dişi üreme sisteminin gelişiminde rol oynar. Fötal testislerden sentezlenen Mülleryan inhibitör madde (Müllerian Inhibiting Substance/MIS), Müller kanalının gelişimini, epitelyal-mezenşimal transformasyon yolu ile engeller. Sekizinci haftada Leydig hücrelerinden salgılanmaya başlayan testosteron erkek genitelyasının gelişimini ilerletir.

Dişi embriyolarda testosteron salgısı olmadığı için Wolf kanalı geriler ve Müller kanalı gelişimine devam eder. Dişi genital yollarının çoğunluğu Müller kanalından köken alır. Tuba uterinalar, Müller kanalının birleşmemiş, kraniyal bölümlerinden oluşur. Kanalin kaudal, birleşmiş kısımlarından ise, uterovajinal primordium farklılaşır (Şekil 2.3). Bu yapı uterus ve vajinayı (üst kısım) oluşturur. Vajinanın 1/3'lük alt kısmı, ürogenital sinüs endoderminden köken alır. Endometrial stroma ve miyometrium komşu splanik mezenşimden (embriyonik mezoderm) gelişmektedir (11).



Şekil 2.3. Yedi haftalık embriyoda seksüel gelişimin farklanmamış döneminde görülen kanallar (11)

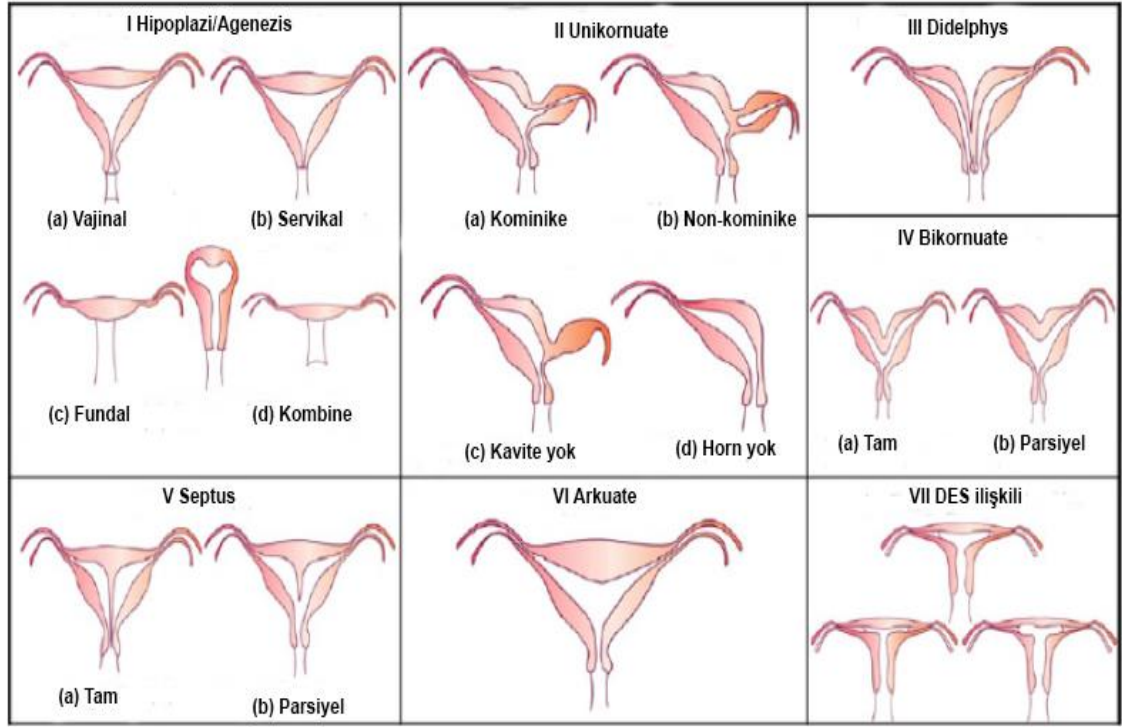
Dişi üreme sistemi; Mülleryan kanalın uzaması, füzyonu, kanal oluşturması, septumun kaybolması aşamalarından geçerek embriyonik gelişimin 22. haftası itibari ile gelişimini tamamlar (12). Ayrıca üreme sistemi kanalları, üriner ve gastrointestinal kanallara yakın olarak gelişirler. Aralarındaki ilişki bireyin hayatı boyunca devam eder.

2.3. Konjenital Dişı Genital Sistem Anomalileri ve Sınıflandırılması

Dişı genital sistemi konjenital anomalileri, normal anatomik yapıdan çeşitli sapmaları kapsar (Şekil 2.4). Bazı anomaliler, embriyolojik gelişimin bir aşamasındaki bozukluğun sonucu iken bazıları birden fazla aşamadaki bozukluk kaynaklı olabilmektedir (13). Günümüze kadar dişı genital kanal anomalilerinin sınıflandırılması için üç sistem oluşturulmuştur. Bunlar; Amerikan Fertilité Derneği (American Fertility Society/AFS) sistemi, genitoüriner malformasyonların embriyolojik-klinik sınıflandırma sistemi ve onkolojik olarak vajina, serviks, uterus, adneks ve ilişkili malformasyonların tümör nod metastaz (TNM) prensibi temelli sınıflandırılması sistemi olarak sıralanabilir (14).

Dişı genital kanal malformasyonları siktir ancak bazen asemptomatik oldukları için her zaman tespit edilemezler. Bu yüzden genel popölasyondaki prevalansı tam olarak bilinmemektedir. Günümüzde geliştirilen çeşitli noninvaziv tanı yöntemleri, genital sistemin anatomik varyasyonlarının teşhisine imkan sağlamıştır. Bu tanı yöntemleriyle beraber dişı konjenital malformasyonların genel popölasyondaki prevalansı yaklaşık %7 olarak bildirilmektedir (15). Genital malformasyona sahip birçok birey asemptomatik olabilmekte, semptomatik olanların şikayetleri ise herhangi bir yaşta, herhangi bir zamanda ortaya çıkabilmektedir. Genel olarak, anomalinin tipine ve bireyin yaşına göre ortaya çıkan semptomlar şu şekildedir: I: Mülleryan ageneziye bağlı amenore, II: Obstrüktif anomalilerde intra ve postmenapozal dismenore, III: Kominike uterusu sahip bireylerde postmenstrual kanama, IV: paramezonefrik kanalların füzyonunun olmaması ile obstrüktif komplikasyonlar ve tekrarlayan düşükler, V: menstrual akıntının atılamayıp birikmesi ve endometriozisin neden olduğu pelvik tümörler, VI: üriner, iskelet ve işitme ile ilgili jinekolojik olmayan problemler (4).

Amerikan Üreme Tıbbı Derneği'nin (American Society for Reproductive Medicine / ASRM) dişı genital kanal anomalilerini sınıflandırma şekli 25 yılı aşkın süredir en yaygın kabul görmüş sınıflandırmadır. Bu sınıflandırmaya göre Mülleryan anomaliler yedi sınıfta incelenir: Sınıf 1: Hipoplazi/Agenezis (a. vajinal, b. servikal, c. fundal, d. tübal, e. kombine), Sınıf 2: Uterus Unikornuate (a. Kominike, b. Non-kominike, c. Kavite yok, d. Horn yok), Sınıf 3: Uterus Didelphys, Sınıf 4: Uterus Bikornuate (a. Tam, b. Parsiyel), Sınıf 5: Uterus septus (a. Tam, b. Parsiyel), Sınıf 6: Arkuate Uterus, Sınıf 7: DES ilişkili (T-şekilli Uterus) (6). Bu anomalilerin şematik gösterimi Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. ASRM'ye göre konjenital dişi genital sistem anomalilerinin sınıflandırılması (16)

Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği (European Society of Human Reproduction and Embryology / ESHRE) ve Avrupa Jinekolojik Endoskopi Derneği de (European Society for Gynaecological Endoscopy / ESGE) ortaklaşa olarak, dişi genital kanal malformasyonlarını kapsayan bir sınıflandırma yapmışlardır. 2015 yılında Ludwin ve arkadaşları bu sınıflandırma kriterleri ile uterus septuslu vakaların daha çok yakalanabildiğini bildirmişlerdir (6). ESHRE-ESGE uterin, vajinal ve servikal anomalileri birbirlerinden ayrı olarak sınıflandırmışlardır. Uterin (U) anomalileri; Sınıf U1: Dismorfik Uterus (a. T-şekli, b. infantil, c. diğ er), Sınıf U2: Uterus Septus (a. parsiyel, b. tam), Sınıf U3: Bicorporeal Uterus (a. parsiyel, b. tam, c. bicorporeal septus), Sınıf U4: Hemi-uterus (a. rudimenter kaviteli, b. rudimenter kavitesiz), Sınıf U5: Aplastik Uterus (a. Rudimenter kaviteli, bilateral veya unilateral horn, b. rudimenter kavitesiz, bilateral ya da unilateral uterin kalıntı/aplazi), Sınıf U6: Klasifiye edilemeyen malformasyonlar olmak üzere altı sınıfta toplamışlardır (14). Bu sınıflandırma sisteminin yaygın kullanımı yoktur.

Yapısal anomaliler tanımlayan sınıflandırmalar doğru tanı ve tedavi için son derece önemlidir. Her bir sınıftaki patoloji, belli kriterler ile tanımlanmıştır. Ancak en ideal sınıflandırmayı oluşturmak için halen araştırmacılar tartışmakta ve yeni öneriler ortaya atılmaktadır. Son dönemde, uygun tedavi açısından daha elverişli olabilecek yeni bir embriyolojik-klinik sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre, dişi üreme

sistemi anomalileri altı gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar; 1) unilateral genitoüriner hipoplazi ya da agenezi, 2) kör hemivajina ve renal agenezinin eşlik ettiği çift uterus formasyonu, 3) izole veya yaygın uterus/uterovajinal anomaliler, 4) aksesuar uterus yapıları ve diğer gubernakulum disfonksiyonları, 5) ürogenital sinus anomalileri ve 6) malformatif kombinasyonları şeklindedir (17).

2.4. Mülleryan Aplazi

Mülleryan Aplazi, ASRM sınıflandırmasına göre sınıf 1 Mülleryan anomalilerden olan ve bu sınıfta en yaygın gözlenen konjenital dişi üreme kanalı bozukluğudur (18). Embriyonik gelişimin 4-12. haftasında paramезonefrik kanalların füzyonunun olmaması ortaya çıkan uterus ve vajinayı etkileyen bir malformasyondur (19). Sendrom ilk kez 1829 yılında Mayer tarafından tanımlanmıştır (20). Daha sonra Rokitansky, benzer malformasyonlara sahip bir olgu bildirmiştir (21). Küster 1910 yılında, bu sendromla ilgili ilk derlemeyi yazan araştırmacıdır (22). Hauser ve Schreiner 1961 yılında bu sendromu ilk kez Mayer-Küster-Rokitansky olarak isimlendirmişlerdir (23). Hauser isminin de eklenmesiyle günümüzde Mülleryan aplazi, Alman araştırmacıların isimlerinden oluşan Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) Sendromu (OMIM 277000) olarak da adlandırılmaktadır. Mülleryan aplazi aynı zamanda, Konjenital Uterus ve Vajina Yokluğu (CAUV; Congenital Absence of Uterus and Vagina), Mülleryan Agenezi, nadiren de etkilenen organlardan yola çıkılarak, Genital Renal Kulak Sendromu (GRES; Genital Renal Ear Syndrome) şeklinde de isimlendirilmektedir (24, 25). Bu tez içerisinde, bahsedilen çalışmada hangi adlandırma kullanıldı ise, o sinonim ad kullanılmıştır.

2.4.1. Mülleryan Aplazinin Klinik Özellikleri

Mülleryan aplazi/MRKH Sendromu/CAUV/Mülleryan agenezi, Mülleryan kanalların embriyonik dönemde gelişimindeki duraksama sonucunda ortaya çıkmaktadır. Fallop tüpleri, uterus ve vajinanın üst 2/3'ünün konjenital aplazisi ile karakterizedir. İç genitelyadaki ciddi defekte karşın dış genitelya normal dişi formasyonundadır. Adölesan dönemde sekonder seks karakterleri normal şekilde gelişir, over işlevleri de normaldir. Olguların büyük çoğunluğu, sitogenetik olarak normal dişi karyotipine sahiptir. İnsidansı 4500 doğumda 1'dir (7, 19). Primer amenorenin, gonadal disgenezisden sonra görülen ikinci en sık nedenidir. MRKH Sendromlu olgular, tüm primer amenoreli olguların %15-20'sini oluşturmakta olup, iki tipte karşımıza çıkmaktadır (7). İzole tip olan; tip I MRKH Sendromu'nda yalnızca Mülleryan aplazi mevcuttur. İkinci tip olan, Tip II MRKH Sendromu'nda ise Mülleryan aplaziye, renal, kardiyak, iskelet sistemi anomalileri ve işitme defektleri ve dijital anomaliler (sindaktili, polidaktili) de eşlik edebilmektedir. Olguların %30'unda unilateral renal agenez ya da en az bir böbreğin ektopisi ve at nalı böbrek şeklinde renal malformasyonlar görülebilir. Eşlik eden iskelet anomalileri; Klippel-Feil anomalisi, birleşmiş vertebralar, servikal skolyoz şeklinde olabilmekte ve çoğunlukla vertebraların etkilendiği anomaliler olmaktadır. Eşlik eden anomaliler dolayısıyla tip II MRKH sendromu, MURCS Asosiasyonu (**M**ülleryan kanal

aplazisi, **R**enal displazi, Servikal/**C**ervical **S**omit anomalileri) (OMIM 601076) olarak da adlandırılmaktadır (24, 26).

Mülleryan Aplazi tanısında, klinik muayene ile birlikte radyolojik görüntüleme teknikleri önem kazanmaktadır. Röntgen çekimi, ultrasonografi, manyetik rezonans görüntüleme tekniklerine hastalığın tanısı için başvurulmaktadır. Laparoskopik cerrahi girişimler de tanı amaçlı kullanılabilir (3).

2.4.2. Mülleryan Aplazinin Genetik Temeli

Bugüne kadar yapılmış olan araştırmalar ile, Mülleryan aplazinin etiyolojisi tam olarak tanımlanmış değildir. Olguların birçoğu izole olmakla beraber, hastalık nadiren ailesel geçiş göstermektedir. Ailesel geçiş gösteren örneklerinde kalıtım tipi genellikle eksik penetrans ve değişken ekspresivitenin varlığında otozomal dominant kalıttır (24). Bazı olgularda otozomal resesif kalıtım paterni de saptanmıştır (27). Hastalık bazı ikizler arasında konkordant iken, bazı monozygotik ikizler arasında diskordant gösterdiği de bildirilmiştir. Bu durum hastalığın gelişiminde; epigenetik mekanizmaların rol oynayabileceğini düşündürmüştür (28). Ayrıca, olguların büyük oranda sporadik oluşu ve genetik komplekslik, hastalık etiyolojisinde poligenik, multifaktöriyel kalıtımın rol oynayabileceği hipotezini de doğurmuştur.

2.4.2.1. Mülleryan Aplazili Olgularda Belirlenen Kromozomal Aberasyonlar

Mülleryan aplazili olguların büyük çoğunluğu 46,XX normal dişi karyotipine sahiptir. Ancak, gerek otozomal gerekse gonozomal kromozomların işe karıştığı kromozomal aberasyonlara sahip Mülleryan kanal anomalili olgular da rapor edilmiştir. Hint bir olguda belirlenen t(12;14) resiprokal translokasyonu, Japon bir olguda saptanan parsiyel 10q26 delesyonu, Fransız araştırmacıların belirlediği 4q34-->qter delesyonu genital gelişim bozukluğu olan olgularda belirlenen otozomal aberasyonlardan bazılarıdır (29-31). Birbirlerinden bağımsız çalışmalar olmak üzere; Meksika, Macaristan ve Amerikalı araştırmacıların Mülleryan aplazili olgularda belirlediği, X kromozomu ilişkili izokromozom, anöploidi, parsiyel delesyonlar, disentrik yapı bulguları da gonozomal kromozom aberasyonlarının örnekleridir (32-35). Literatür verilerine göre, mozaik gonozomal kromozom aberasyonları Mülleryan aplazili olgularda daha sık gözlenmektedir.

2.4.2.2. Mülleryan Aplazinin Genetik Temelini Aydınlatmada Kopya Sayısı Varyasyonları Analizi

Son yıllarda, hastalıkların bilinmeyen etiyolojisini belirlemeye yönelik yapılan kopya sayısı varyasyonları (Copy Number Variations, CNV) çalışmaları yaygınlaşmıştır. Bu alanda gelişen teknolojiler araştırmacılara büyük çaplı ve informatif veri elde etme imkanını sağlamıştır. CNV; genomda iki kopya halinde bulunan bir DNA bölgesinin delesyonu ya da amplifikasyonudur. CNV'ler 1 Kb-1 Mb büyüklüğündeki

dengelesiz genomik varyasyonlardır. Elde edilen veriler, genomun %10'unda yaygın olarak saptanan CNV'ler olduğunu göstermektedir (36). Sitogenetik analiz ile saptanamayan submikroskopik CNV'ler, mikrodizin ya da Array-CGH gibi gelişmiş teknolojiler aracılığıyla belirlenebilmektedir. CNV'ler, tüm genoma komplementer oligo ya da SNP problemlerin kullanıldığı mikrodizin platformlarının verileridir. CNV'ler, genomun herhangi bir bölgesinde saptanabilir. Kodlama yapmayan DNA dizilerindeki kopya sayısı değişimleri gen ürününün fonksiyonundan çok, dozajını etkilemektedir. CNV'ler patolojik olabildiği gibi bireyler arası çeşitliliğe sebep olan heteromorfizm olarak tanımlanan patolojik olmayan CNV'ler de vardır. Herhangi bir hastalığa yol açmayıp, bir sonraki kuşağa kalıtılan ve bireyler arasında farklılık gösteren CNV'ler, gen lokalizasyonunu belirleme araştırmalarında, tek nükleotid polimorfizmleri gibi kullanılabilir (37). Hastalıklardan sorumlu aday genleri belirlemek için en sıklıkla kullanılan teknik linkaj analizidir. MRKH Sendromu ile ilgili aday genleri belirlemek üzere tüm genomu kapsayan linkaj analizi henüz yapılmamıştır. Bu durumun başlıca nedeni ailesel olguların oldukça nadir olması, ailesel vakalarda da hastalıktan etkilenmiş bireylerin yalnızca iki jenerasyonda gözlenmesidir. Böyle durumlarda, Array-CGH, malformasyon sendromları ile ilişkili yeni aday genleri araştırmak için oldukça etkin kullanılan bir tekniktir.

Array-CGH tekniğinin kullanıldığı, Cheroki ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada, Mülleryan aplazi fenotipine, kalp, iskelet, işitme bozuklukları ya da mental retardasyonun da eşlik ettiği 14 Brezilyalı olgu incelenmiştir. Olguların dört tanesinde (%29) submikroskopik kromozomal değişimler (CNV) saptanmıştır. Bir olguda, sağlıklı anneden kalıtılan 1q21.1 ve 22q11.21'de duplikasyon, diğer olgularda; 7q12, 22q11.21 ve Xq21.31 bölgelerinde de novo delesyonlar saptanmıştır. Bu kromozomal bölgelerde lokalize genlerin Mülleryan kanalda ifade edildikleri ve Mülleryan gelişim için önemli oldukları belirtilmiştir (38).

2009 yılında Bernardini ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise, iki CAUV'li olguda, CGH-array (Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon Array) analizi ile, 17q12 bölgesinde 1.5 Mb'lık genomik DNA delesyonu saptanmıştır. Delesyon bölgesi, Hepatosit Nükleer Faktör 1 Beta (*HNF1B/TCF2*) (NM_000458.3) ve LIM homeobox protein 1 (*LHX1*) (NM_005568.4) genlerini içermektedir. *HNF1B* mutasyonlarının, MODY (maturity-onset diabetes of the young) tipi diabet ve renal anomaliler ile ilişkisi bilinmektedir. Bu gen mutasyonuna sahip bazı hastalarda, renal doku ile aynı mezodermden köken aldığı bilinen genital sistem anomalilerine de rastlanmıştır. DNA'ya bağlanan bir transkripsiyon faktörü kodlayan *LHX1* ise, farelerde genitoüriner sistemin gelişiminde fonksiyon gördüğü gösterilmiş bir genidir. Aynı araştırma grubu tarafından, 20 CAUV'li olguda yapılan dizi analizinde, bu genlerde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır (39). *LHX1*, çeşitli çalışmalarca dişi genital sistemi gelişimindeki rolü hala araştırılan önemli genlerden biridir. 2004 yılında Kobayashi ve arkadaşları, *Lhx1* geni yoksun (*Lim1*^{-/-}) farelerde, fallop tüpleri, uterus ve vajinanın üst kısmının gelişmediğini göstermiştir (40). *Lhx1* yoksunluğu, *Wnt4* ^{-/-}den farklı olarak, erkek farelerde Wolf kanalı gelişiminin de gerçekleşmemesine neden olmuştur. Bu

fareler, insanlardaki Mülleryan aplazi fenotipi gibi normal overlere sahiptirler. Kobayashi'nin bulgularından sonra, 62 MRKH sendromlu olgularda *LHX1* geni dizi analizi yapan Ledig ve arkadaşları, dur kodonu oluşumu ile sonuçlanan çerçeve kayması mutasyonu (c.25dup; p.Arg9LysfsX25) saptamışlardır. Aynı ekip daha önce yaptıkları çalışmalarında da, tip 1 Mülleryan aplazili bir olgunun *LHX1* geninde heterozigot yanlış anlamlı mutasyon (p.Arg264Gly) belirlediklerini bilmişlerdir. Bu bulgulara dayanarak; *LXHI* geni mutasyonların, MRKH sendromuna neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir (41).

2010 yılında Gervasini ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile, beş Mülleryan aplazi tanılı olguda (iki kız kardeş, üç sporadik) parsiyel Xp22.33'de lokalize *SHOX* geni (OMIM 312865) duplikasyonlarının saptanması, hastalığın genetik nedenini belirleme açısından umut verici olmuştur. *SHOX* geni ürünü, büyüme ve gelişmede işlev gören oldukça önemli bir proteindir. *SHOX* mutasyonları sonucu sıklıkla çeşitli iskelet sistemi anomalileri ortaya çıkmaktadır (42). Sandbacka ve arkadaşları, 101 Finli Mülleryan aplazili olgu ve 115 sağlıklı kontrolde, multipleks ligasyona-dayalı prob amplifikasyon (MLPA) tekniğini kullanarak, *SHOX* genini kapsayan CNV'leri araştırmışlardır. Bütün hastaların *SHOX* geninde normal patern saptanmıştır. Beş hasta, ve yedi kontrol olguda genin aşağı bölgesinde saptanan duplikasyon ve delesyonlar, kopya sayısı polimorfizmleri (CNP) olarak nitelendirilmiştir. Bu çalışma ile *SHOX* genindeki CNV'ler ile Mülleryan aplazi arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (43).

Nik-Zainal ve arkadaşları, Mülleryan aplazili 63 olguda kopya sayısı varyasyonlarını 2011 yılında yaptıkları çalışma ile araştırmışlardır. Dokuz olguda (%14) patolojik CNV saptanmıştır. Agilent 244K oligonükleotid array platformu ile saptanan CNV'ler, Real Time-Kantitatif PZR (RT-qPCR) ile doğrulanarak 6p11.2, 7q12 ve 22q11.2'de mikrodelsiyon, 2q11.2'de mikroduplikasyon olduğu belirlenmiştir. 7366 kontrol bireyden ikisinde de CNV belirlenmiştir. Kontrol ve hasta grubu karşılaştırıldığı zaman, CNV saptanan hasta sayısı, kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=6.98e-8$, Fisher's exact test) (44).

Morcel ve arkadaşları 2011 yılında, MLPA tekniği ile 57 Mülleryan aplazili olguda CNV analizi yapmışlardır. Sonuç olarak, 4q34-qter, 8p23.1, 10p14 ve 22q11.2 olmak üzere dört kromozomal lokusta delesyonlar saptamışlardır. Bu dört lokustaki varyasyonların, DiGeorge Sendromu ya da DiGeorge benzeri fenotipe neden oldukları bilinmektedir. Araştırmacılar bu durumu Mülleryan aplazinin, geniş spektrumlu kliniğe sahip olan DiGeorge Sendromu'nun ek bir bulgusu olabileceği şeklinde yorumlamıştır. DiGeorge Sendromu ve Mülleryan aplazi ilişkisini açıklayan başka çalışmalar yapılmamış olup, bu konu halen aydınlatılmamıştır (45). Bu çalışmada da olduğu gibi MLPA tekniği CNV araştırmalarında kullanılan bir yöntemdir. MLPA, tek bir reaksiyonda 50 DNA dizisine kadar analiz yapabilmeyi sağlar. Şu ana kadar ticari olarak oluşturulmuş 300'ün üzerinde prob seti bulunmaktadır. Problar spesifik hastalıkların tanısı için dizayn edilmiştir. Özellikle DNA kopya sayısı değişimleri ile meydana gelen

hastalıklarda intragenik CNV'lerin saptanması için oldukça elverişlidir. Ancak mikrodizin teknolojileri ile tespit edilebilen küçük CNV'ler, bu teknik ile belirlenememektedir (46).

Sandbacka ve arkadaşlarının 2013 yılında 50 Mülleryan aplazili olguda yaptıkları CNV analizi sonucu sekiz olguda dokuz CNV saptamışlardır. Bu CNV'lerden birisi literatürde başka olgularda da belirlenen 16p11.2 delesyonudur. Bu bölgede lokalize *TBX6* geninin (NM_004608.3) dizi analizi sonucu 112 hastanın ikisinde heterozigot mRNA kırılma mutasyonu (c.622-2A>T) saptamışlardır. En az bir kere doğum yapmış 200 kontrol olguda, herhangi bir varyasyon saptanmamıştır. *LHX1* geni varyasyonlarını da inceleyen araştırmacılar yaptıkları dizi analizi ile, 5 hasta olguda 3 yanlış anlamlı varyasyon (p.Cys4Ser, p.Pro312His, p.Arg332Pro) saptamışlardır. p.Cys4Ser ve p.Pro312His varyasyonları ilk kez bu çalışma ile bildirilmiştir. Genel olarak hastalarda saptadıkları CNV, *TBX6* ve *LHX1* gen varyasyonlarının oranı %26.8 olarak belirlenmiştir (47). Mülleryan aplazi ile ilişkisi açısından dikkat çeken *TBX6* geninin embriyonik gelişimde önemli rol oynadığı daha önce yapılan çalışmalarca gösterilmiştir (48).

McGowan ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmaya göre ise, 24 Mülleryan aplazili olguda beş dengesiz genomik varyasyon saptanmıştır. Bu varyasyonlardan 1q21 bölgesindeki mikroduplikasyon, biri 0.257 Mb, diğeri 4.6 Mb büyüklüğünde olmak üzere, iki olguda tespit edilmiştir. Diğer varyasyonlar ise, 1q44, 4q35.2, 13q21 ve Xq22.3 bölgelerinde belirlenmiştir. McGowan ve arkadaşlarına göre, tüm çalışmalara bakıldığında zaman Mülleryan aplazi ile ilişkisi açısından öne çıkan genler *LHX1*, *TBX6* ve *HNF1B*'dir (17).

Mevcut genomik analiz yöntemlerine, son yıllarda hızlı ve oldukça kapsamlı veri üreten yeni nesil dizileme metodları da eklenmiştir. Bu metodun Mülleryan aplazili'nin genetik temelini aydınlatmaya yönelik olarak kullanıldığı ilk çalışma 2015 yılında Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadır. Araştırmacılar, beş tip 1 MRKH sendromlu hastada tüm ekzom dizileme ve SNP array ile CNV analizi yapmışlardır. "3-hit" prensibi olarak tanımladıkları yaklaşımları ile, en az üç varyasyon görülen bölgeler belirlenmiştir. Buna göre; olfaktor reseptör aile 4 alt aile M üye 2 (*OR4M2*), fosfodiesteraz I IA (*PDE1 IA*) genlerinde fonksiyon kaybına yol açan varyasyonlar, 1p36.21, 1q44, 15q11.2 ve 19q13.31 bölgelerindeki delesyonlar öne çıkmıştır. Bu gen ve bölgeler, tip 1 MRKH sendromu ile ilişkili olası aday genomik bölgeler olarak değerlendirilmiştir (49).

Sonuç olarak, Mülleryan aplazili olgularda Array-CGH tekniği ile CNV analizinin yapıldığı beş çalışmanın sonuçlarına göre klinik olarak anlamlı beş spesifik kromozomal bölge karşımıza çıkmaktadır. Bu bölgeler 1q21.1, 7p14.3, 16p11.2, 17q12 ve 22q11.21-q11.23'dür (17). Bugüne kadarki araştırmalara bakıldığında zaman Mülleryan aplazili bireylerde genomun geneline yayılmış CNV'ler dikkat çekmektedir. Monozigotik ikizler

arasındaki diskordansinin kısmen temelinde yatan olayın, de-novo CNV'ler ve CNV mozaizmi olabileceği düşünülmektedir (50).

Çalışmaların geneline bakıldığı zaman konvansiyonel sitogenetik analizden kaçan submikroskopik CNV'lerin analizi, kökeni bilinmeyen hastalıkların aydınlatılması açısından hala etkin yöntemdir. CNV analizinin yapıldığı sistemler esnek olup, sipariş usulü prob sayısının genomun belli bölgesinde arttırılmasıyla, hedef genomik bölge daha detaylı olarak incelenebilmektedir. Elde edilen veriler en yaygın olarak Database of Genomic Variants (DGV) veritabanı ile karşılaştırılmaktadır. Bu veritabanında yer alan HapMap projesi verilerini de içeren binlerce sağlıklı kontrole ait CNV verisi, hastalık etkeni CNV'leri belirlemek için kullanılmaktadır. Herhangi bir patolojik CNV, belli fenotipteki hasta grubunda artış gösteriyor ise o bölge hastalık için potansiyel aday bölge olarak düşünülmektedir. CNV saptanmayan aynı fenotipe sahip diğer hastalarda o bölgedeki genlerin mutasyon analizi, CNV çalışmalarından sonraki basamağı oluşturmaktadır. Genlerden birinde mutasyon saptanması, aday gen olasılığını arttırmakta ve fonksiyonel çalışmaların öncüsü olmaktadır. Bu yolla hastalıkların bilinmeyen patofizyolojisi aydınlatılabilmektedir.

Tüm genomu belli aralıklarla dağılmış problemlerle elde edilen CNV bulguları, genomu ait kapsamlı veri sunmaktadır. Bu yaklaşım ile sebebi bilinmeyen mental retardasyonlu olguların %15-20'sinin etiyolojisi açıklanmıştır. Dolayısıyla, Array-CGH ya da DNA mikrodizinin sistemleri, malformasyon sendromları ile ilişkili yeni genlerin bulunması için oldukça elverişli tekniklerdir (38).

2.4.2.3. Mülleryan Aplazinin Genetik Temelinin Aydınlatılmasında Aday Gen Yaklaşımı

1996 yılından bu yana yapılan genetik temelli çalışmalarda, aday gen yaklaşımı ile Mülleryan aplazinin genetik temelini aydınlatmaya yönelik olarak çeşitli nükleer genlerin hastalık ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu genlerden başlıcaları; Galaktoz -1-Fosfat Üridiltransferaz (*GALT*) (NM_000155.3), Wingless-tip MMTV Entegrasyon Site Ailesi 4. üyesi (*WNT4*) (NM_030761.4), Wilms Tümör 1 (*WT1*) (NM_000378.4), Paired Box 2 (*PAX2*) (NM_000278.3), Homeobox A7 (*HOXA7*) (NM_006896.3), Homeobox A13 (*HOXA13*) (NM_000522.4), LIM Homeobox 1 (*LHX1*) (NM_005568.4), Hepatosit Nükleer Faktör 1B (*HNF1B*) (NM_000458.3), Kelch-benzeri Aile üyesi 4 (*KLHL4*) (NM_019117.4), Short Stature Homeobox (*SHOX*) (NM_000451.3), Anti-Mülleryan Hormon (*AMH*) (NM_000479.3), Anti-Mülleryan Hormon Reseptörü (*AMHR*) (NM_001164690.1), Pre-B Hücre Lösemi Homeobox 1 (*PBX1*) (NM_001204961.1), Kistik Fibroz Transmembran Konduktans Regülatör (*CFTR*) (NM_000492.3), Retinoik Asit Reseptör Gama (*RARG*) (NM_001243731.1), ve Retinoik Asit X Reseptör Alfa (*RXRA*) (NM_001291920.1) genleridir (51, 52).

Mülleryan Aplazinin moleküler patogenezeine yönelik ilk bilgilerden biri 1996 yılında literatürde yerini almıştır. Bu çalışmada Cramer ve arkadaşları, anormal galaktoz metabolizmasının CAUV'ye yol açtığını ileri sürmüşlerdir (53). Bilindiği gibi, galaktoz metabolize edilerek, glikolitik yolda enerji üretimi için kullanılmaktadır. Galaktozu metabolize eden enzimlerden birini kodlayan, 9p13'de lokalize Galaktoz-1-Fosfat Üridil Transferaz (*GALT*) (NM_000155.3) genindeki fonksiyon kaybı mutasyonlarının galaktozemiye, biriken galaktoz ya da metabolitlerinin gonadal disfonksiyona sebep olduğu bildirilmiştir (54). *GALT* geninde saptanan p.N314D allelinin, CAUV ile ilişkili olduğu ileri sürülerek, bu varyasyonun CAUV'nin etiyolojik nedenleri arasında yer alabileceği belirtilmiştir. Bu bilgilere dayanarak, 2003 yılında Klipstein ve arkadaşları, Kafkas kökenli 32 CAUV'li hasta ve 138 sağlıklı kontrol olguda p.N314D allelinin varlığını araştırmışlardır. Sonuç olarak CAUV ve p.N314D polimorfizmi arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$) (27).

Mülleryan aplazinin genetik temelini aydınlatmak için en çok çalışılan genlerden bazıları, WNT ailesi (wingless-type MMTV integration site family) üyeleridir. Bu genlerin protein ürünleri, embriyogenez sırasında hücre içi sinyal molekülü olarak görev almaktadır. Farelerde yapılan çalışmalar, bu proteinlerin dişi üreme sistemi oluşumunda görev aldığını göstermiştir. Bugüne kadar, Mülleryan aplazi ile ilişkisi en iyi bilinen gen, bu aile üyesi olan *WNT4* (NM_030761.4) genidir. Bu ilişki ilk kez 1999 yılında Vainio ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Knock-out yaklaşımının uygulandığı çalışmada, fonksiyonel olmayan protein oluşumuna sebep olan *Wnt4* mutant farelerin organ gelişimleri incelenmiştir. Homozigot *Wnt4* mutant fareler, doğduktan kısa bir süre sonra böbrek anomalisi nedeniyle ölmüşlerdir. Bu yüzden araştırmacılar, embriyonik gelişimlerinin 18,5. haftasında olan ya da yeni doğan fetusları incelemişlerdir. Homozigot mutant erkek embriyoların üreme sistemleri gelişiminin normal olduğu, morfolojilerine ve Sertoli spesifik hücre markırlarının ekspresyon seviyesine bakılarak tespit edilmiştir. Ancak homozigot mutant dişi embriyoların üreme sisteminde, internal organ gelişiminin maskülen benzeri olduğunu belirlemişlerdir. MIS'in erkek embriyolarda henüz Mülleryan kanal dejenerasyonuna başlamadığı 14,5 haftalık embriyolarda *Wnt7a* ve *Pax8* protein ekspresyonlarına bakılarak Mülleryan kanal oluşumu incelenmiştir. Mülleryan kanal gelişiminin heterozigot mutant dişi ve erkek embriyolarda gerçekleştiğini, homozigot mutant erkek ve dişilerde Mülleryan kanalın oluşmadığını saptamışlardır. Diğer taraftan mutant dişi farelerin eksternal genitalyası normal dişi görünümünde bulunmuştur (55). Bu bulgular, insan Mülleryan aplazi fenotipi ile uyumlu görünmektedir. 2009 yılında, Ravel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 11 Kafkas kökenli MRKH Sendromlu olguda, WNT ailesi üyelerinden 1p36.23'de lokalize *WNT4A*, 3p21'de lokalize *WNT5A*, 3p25'de lokalize *WNT7A* ve 17q21'de lokalize *WNT9B* genlerinin kodlayıcı dizilerindeki varyasyonlar, DNA dizi analizi yöntemi ile incelenmiştir. Olgularda, c.483C>T:*WNT4*, c.459T>C:*WNT7A*, c.861G>A:*WNT7A*, c.317T>C:*WNT9B* olmak üzere dört varyasyon saptanmıştır. Yalnızca iki hastada varyasyon belirlenmezken, dokuz hastada bu varyasyonlardan en az bir tanesi saptanmıştır. *WNT4* ve *WNT7A* genlerinde varyasyonlar sinonim olup, yalnızca *WNT9B* genindeki varyasyon nonsinonim özelliktedir. Diğer taraftan

WNT9B'deki varyasyon, Kafkas ırkının %30'unda belirlenmiştir. Araştırmacılar, *WNT* ailesi üyelerinde patojenik bir mutasyon bulmamalarına rağmen, MRKH Sendromu ve *WNT* gen mutasyonları ilişkisinin var olma olasılığını dışlamamaktadır. Çünkü *WNT* gen ailesi üyelerinin, insan genital kanallarının oluşumunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan mutant ve knock-out hayvan modellerinde oluşan iç genitalya defektleri de bunu desteklemektedir (52). Wang ve arkadaşları 2014 yılında yayınladıkları 42 Çinli MRKH sendromlu, 42 sağlıklı kontrol bireyin yer aldığı çalışmalarında, bir hastanın, *WNT9B* geninde biri yanlış anlamlı biri 3'UTR bölgesinde olmak üzere iki yeni/novel varyasyon saptamışlardır. Daha çok olguda bu varyasyonların taranması ve fonksiyonel çalışmalar ile bu varyasyonların patojenitesinin belirlenmesi gerektiğini belirtmişlerdir (56).

Hastalıkların genetik kökenlerini aydınlatmak için, belirlenen olası aday genlerde mutasyon taramaları önemli yer tutmaktadır. Bu yaklaşım, Mülleryan aplaziden sorumlu olabileceği öngörülen genlerden biri olan *AMH* (NM_000479.3) için de uygulanmıştır. 19p13.3 lokusunda lokalize Mülleryan inhibitör madde (MIS) olarak da bilinen *AMH* ve reseptörünü kodlayan 12q13'de lokalize olan *AMHR* geni ürünleri, erkek gonad dokusunun Mülleryan kanal yönünde gelişimini engellemektedir. Sertoli hücrelerinden sekresyonu yapılan AMH proteini, embriyonik gelişimin 6. haftasından 9. haftasına kadar, parakrin bir mekanizma aracılığıyla, apoptoz aracılı Mülleryan kanal regresyonuna yol açmaktadır. Puberteye kadar, AMH seviyesi erkeklerde yüksek düzeydedir (57). Erkek bireylerde bu genlerde oluşan fonksiyon kaybı mutasyonları, Mülleryan kanalların oluşumuna neden olmaktadır. Ancak bu genlerin fonksiyon kazanımı mutasyonları henüz tanımlanmamıştır. 2001 yılında Resendes ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, CAUV hastalarında bu genlerdeki fonksiyon kazanımı mutasyonları araştırılmıştır. Çalışmada, çeşitli etnik gruplardan 22 CAUV'li hasta, 96 kontrol olgu yer almıştır. *AMH* geninin tüm ekzonları, denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE) yöntemi ile taranmış; hasta grupta % 9,5; kontrol grubunda % 2,6 sıklıkta bir polimorfizm, heterozigot olarak saptanmıştır. Dizi analizi ile bu polimorfizmin, c.3865C>A olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, gen ürününün aminoasit dizisinde herhangi bir değişime yol açmayan bu varyasyonun, enhancer bölgesinde olabileceği ya da mRNA stabilitesini etkileyebileceğini ileri sürmüşlerdir. Halen bu konuya ait literatür bilgisi mevcut değildir (58). 2005 yılında Oppelt ve arkadaşlarının, 30 Mülleryan aplazili olguda *AMH* geni promotor ve regülatör elementlerinin varyasyonlarını araştırdıkları çalışmalarında, hasta grubun %73'ünde, kontrol grubun ise %69'unda varyasyonlar saptanmıştır. Dolayısıyla bu varyasyonların hastalık ile anlamlı bir ilişkisi bulunamamıştır (57). AMH yolağının Mülleryan aplazi ile ilişkili olabileceği hipotezi bu yolağın regülatörlerinin de hastalıkla ilişkisinin araştırılmasına yol açmıştır. Bu regülasyonda görev alan beta katenin, hem hücre-hücre adezyonunu hem de hücrel sinyal iletiminde fonksiyon gösteren bir proteindir. Ayrıca, AMH bağımlı Mülleryan dejenerasyonda görev aldığı gösterilmiştir. Peri-mülleryan hücrelere AMH'nin etki etmesi, Mülleryan kanal regresyonuna korele olarak sitoplazmik β -katenin artışına sebebiyet vermektedir. Bu durum, β -kateninin, Limfoid enhancer factor 1 (LEF/TCF) ailesi üyeleri ile heterodimerizasyon yapısını oluşturarak, gen

transkripsiyonunu aktive eden ya da baskılayan etkili bir kompleks oluşumuna yol açmaktadır. β -kateninin *AMHRII* gen promotoru aktivasyonu için gerekli olduğu daha önce gösterilmiştir. Dolayısıyla Drummond ve arkadaşları 2008 yılında β -katenin geni (*CTNNB1*) (NM_001904.3) mutasyonlarının Mülleryan defektlerle ilişkili olabileceği hipotezini ortaya atmışlardır. Buna bağlı olarak *CTNNB1* geninin 3 numaralı ekzonunda yer alan ve aktivasyonunu sağlayan Glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK-3 β) fosforilasyon bölgesinin Sanger dizileme tekniği ile dizi analizini yapmışlardır ancak herhangi bir varyasyon saptamamışlardır (59).

2003 yılında Timmreck ve arkadaşları, 7q31.2'de lokalize *CFTR* geni (NM_000492.3)(OMIM 602421) ve CAUV ilişkisini araştırmışlardır. *CFTR*, epitel hücrelerinde klor kanallarının oluşumunda ve bu kanallardan klor iyonlarının akışının regülasyonunda görev alan bir membran glikoproteindir. 25 CAUV'li olgunun yer aldığı çalışmada, en yaygın 30 *CFTR* mutasyonunun varlığı araştırılmıştır. İki hastada heterozigot p.W1282X ve p.delF508 mutasyonları saptanmıştır. Bu çalışma ile, CAUV'li hastalarda, *CFTR* geninde %8 olarak belirlenen mutasyon sıklığının, genel populasyondan (%4) iki kat fazla olduğu belirlenmiştir (60). Benzer bir çalışma 2006 yılında Alper ve arkadaşları tarafından yapılmış olup, 14 Türk CAUV'li olgunun genomik DNA örneklerinde, *CFTR* geninin tüm ekzonları, denatüre edici yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (DHPLC) tekniğini takiben DNA dizi analizi yöntemi ile taranmıştır. Türk CAUV'li olgularda, *CFTR* geni mutant allel oranı %14 (4/28) olarak saptanmıştır. Bir olguda homozigot c.1210-12[5](IVS8-5T); diğer olgularda heterozigot p.R31C ve c.406-6T>C değişimleri belirlenmiştir. Bu çalışma Türk CAUV'li olgulara ait *CFTR* geni varyasyonları profilinin belirlendiği ilk araştırmadır (61). Literatür verilerine bakıldığı zaman *CFTR* geni hem dişi hem de erkek genital sistemi gelişiminde rol oynamaktadır. Konjenital Bilateral Vas Deferens Yokluğu (CBAVD) olan erkeklerde de *CFTR* mutasyonları saptanmaktadır. *CFTR*'ın genital gelişim üzerine etkisinin hangi moleküler mekanizma ile gerçekleştiğine dair bir hipotez, sıçanlarla yapılan bir araştırma ile ortaya atılmıştır. Sıçan hipotalamusunda yer alan seksüel gelişimin regülasyonunun gerçekleştiği bölgede *CFTR* mRNA ekspresyonu olduğu bulunmuştur. Bu bölge GnRH ve östrojen-zengin nöronların yoğun olduğu bir bölge olarak tanımlanmaktadır. Araştırmacılar, *CFTR*'ın sinaptik veziküllerin asiditesini arttırarak seksüel gelişim ve fertilite üzerine etki edebileceğini ileri sürmektedirler (62).

Sandbacka ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan ilginç bir çalışmada ise, Mülleryan aplazinin gelişiminde Y kromozomunun rolü araştırılmıştır. Çalışma kapsamında, hastalarda Y ilişkili Testis Spesifik Protein 1 (*TSPY1*) geni ve 38 Y kromozomu spesifik fragman taranmıştır. Mülleryan aplazili 110 Finli hasta ve bazı hastaların 20 sağlıklı akrabası, kontrol grubu olarak da en az bir hamilelik geçirmiş 100 sağlıklı kontrol birey çalışmaya dahil edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile Y kromozom spesifik fragmanların hiçbirisi hasta ve kontrol gruplarında saptanmamıştır. Bu çalışma ile, Y kromozomunda lokalize genlerin Mülleryan aplazi gelişiminde rol almadığı tespit edilmiştir (63).

Bilindiği üzere, epigenetik regülasyon mekanizmalarındaki varyasyonlar da, hastalıkların etyopatogenezinde rol alabilmektedir. Silver-Russell Sendromu (OMIM 180860) bu hastalıklara bir örnektir. İlginç olarak Silver-Russell ve MRKH sendromlarının bazı hastalarda beraber seyrettiği görülmüştür. Literatürde, bu şekilde üç olgu bildirilmiştir (64). Bu noktadan yola çıkarak, 2011 yılında Silver-Russell Sendromlu bireylerde bulunan H19 imprinting kontrol bölgesindeki (ICR1) hipometilasyonun aynı zamanda Mülleryan aplaziye neden olup olmadığı araştırılmıştır. 80 Finli Mülleryan aplazili hastada H19 ICR1'in, kantitatif RT-PCR ile metilasyon analizi yapılmıştır. Ancak hastalık ile bu bölgenin metilasyon profili arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Seksen hastanın 38'inde, H19 lokusunun çalışılan 16 bölgesinin üçünde artmış metilasyon profili saptanmıştır. Bu sonuçlar ile Mülleryan aplazinin epigenetik kökeninin, daha fazla araştırılarak aydınlatılması gerektiği ortaya çıkmıştır (65).

Homeobox (*HOX*) genleri vücut eksenini boyunca şekil belirleme işlevinden sorumludur. En az 20 insan *HOX* geni çeşitli bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (66). Farelerde *HOXA10* (NM_018951.3) geni fonksiyon kaybı mutasyonlarının uterus malformasyonlarına neden olduğu gösterilmiştir. Embriyonik dönemde Mülleryan kanallarda ifade edildiği gösterilen *HOXA10* geninin normal genital gelişim için önemli olduğu düşünülmektedir. 2008 yılında, Lalwani ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, gelişmekte olan yetişkin uterusunda ifadesi olan ve uterus gelişiminde önemli rol oynayan *HOXA10* geninin CAUV ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışma kapsamında, 26 CAUV hastası, 30 sağlıklı kontrol bireyin genomik DNA örneklerinde, DGGE yöntemi ile yapılan mutasyon taraması sonucu, *HOXA10* geninde mutasyon saptanamamıştır. Bu sonuca göre *HOXA10* gen mutasyonları ile CAUV ilişkili bulunamamıştır (67). 2014 yılında Chen ve arkadaşları, içinde Mülleryan aplazili olguların da bulunduğu 192 Mülleryan kanal anomalisi olan Çinli olguda yaptıkları, bir başka *HOX* geni olan *HOXA11*'in tüm gen dizi analizi ile, *HOXA11* varyasyonları ve Mülleryan aplazi ilişkisine dair bir kanıt bulamamışlardır (68).

Nükleer gen varyasyonlarının araştırıldığı çalışmalar, Mülleryan aplazinin genetik temelini açıklamakta yetersiz kaldığından, hastaların tüm genom metilasyon profilleri incelenmiştir. 2011 yılında Rall ve arkadaşları, 8 Alman Mülleryan aplazili hasta ve 8 kontrol bireyin tüm genom metilasyon ve ekspresyon profilini karşılaştırmışlardır. İki grup arasında 293 farklı ekspresyon, 194 farklı metilasyon paterni olan gen saptamışlardır. Hem metilasyon hem de ekspresyon paterni farklılık gösteren gen sayısı 9 olarak belirlenmiştir. Bu çalışma ile, östrojen reseptörlerinin eksikliği ve bazı *HOXA* genlerinin ektopik ekspresyonunun söz konusu patolojiye neden olabileceği öne sürülmüştür. Gebelikte maruz kalınan yüksek seviyedeki maternal hormonların, *HOXA* genlerinin ektopik ekspresyonuna sebep olacağı düşünülmektedir (28). Nodale ve arkadaşları da 2014 yılında, 8 MRKH sendromlu, 5 sağlıklı bireyin vajina dokusundan oluşturdukları primer hücre kültüründen elde edilen RNA örnekleri ile, tüm genom ekspresyon profillemesi yapmışlardır. Bu çalışmaları ile, 133'ü downregüle, 142'si upregüle olan 275 gen ekspresyon farklılığı belirlemişlerdir. Bütün hastalarda *MUC1*

(Mucin 1, Cell Surface Associated) upregülasyonu, *HOXB2*, *HOXB5* downregülasyonu, birçok hastada da NOTCH ligandları olan *JAG1* (Jagged 1), *DLL1* (Delta-like 1) downregülasyonu saptamışlardır. Araştırmacılar bu çalışmaları ile embriyonik gelişimde önemli rol oynayan genlerin değişmiş ifadelerini belirleyerek, MRKH Sendromu etyopatogenezinin anlaşılmasına katkı sağlamışlardır (69).

Mülleryan aplazinin genetik etyopatogenezinin tanımlamaya yönelik olan çalışmalardan biri de ikizler arasındaki diskordansı açıklamaya yönelik olmuştur. Rall ve arkadaşlarının 2014 yılındaki çalışmalarında, Mülleryan aplazi açısından diskordant olan 5 monozigotik ikiz çiftinin, kan, tükürük ya da rudimenter uterus dokularına ait DNA örnekleri ile CNV analizi yapılmış ve karşılaştırılmıştır. Mülleryan aplazili ikizlerden birinde Matriks Metalloproteinaz 14 (*MMP14*) ve Low Density Lipoprotein Reseptör-ilişkili Protein 10 (*LRP10*) genlerini kapsayan bir duplikasyon bulunmuştur. Bu duplikasyon uterus dokusunda saptanırken, tükürük örneğinde saptanmamıştır. Araştırmacılar buldukları doku spesifik mozaizmin, ikizler arasındaki diskordansı açıklayabileceğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca, Mülleryan kanal epiteli ve onu çevreleyen ekstraselüler matriks arasındaki sinyalleşmenin ve bu sinyalleşmede önemli fonksiyon gösteren Fosfoinozitol 3 Kinaz (PI3K)/Akt sinyal yolağının, Mülleryan kanal gelişiminde anahtar rol oynayabileceğini belirtmektedirler. Nitekim, PI3K/Akt yolağı Matriks Metalloproteinazların (MMP) aktivasyonu için de gereklidir (50). Ekstraselüler matriks ve dişi üreme sistemi ilişkisini araştıran çalışmalardan bir diğeri, 2012 yılında Morcel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır. Morcel ve arkadaşları, uterovajinal aplazisi olan bir olguda 10p14 delesyonu saptamışlardır. Delesyon bölgesinde, ekstraselüler matriks dinamiğinde görev alan proteinleri kodlayan inter-alfa-tripsin inhibitor ağır zincir 5 (*ITIH5*) geni lokalizedir. Araştırmacılar, *ITIH5* geninin MRKH sendromu için olası bir aday gen olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu bulgulara göre, ekstraselüler matriks elemanlarının embriyonik dönemde dişi üreme sistemi gelişiminde rol oynayabileceği görüşü ortaya çıkmaktadır (70).

Yapılan bütün çalışmalara bakıldığı zaman, Mülleryan aplazinin moleküler patogenezi halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Bunun durumun nedenleri arasında, aday genlerin belirlenmesindeki zorluklar ve olası aday gen bölgelerinin detaylı çalışılmaması yer almaktadır. Aday genlerin belirlenmesinin önündeki en büyük engel ise ailesel olguların nadir rastlanması ve uygulanacak teknikler açısından maliyetin pahalı olmasıdır. Mülleryan aplazi çalışmalarının nispeten yoğunlaştığı 2001 yılından bu yana, Mülleryan aplaziden etkilenmiş bireyler üzerinde sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Hastalık ile ilişkili genlerin tanımlanması; hastalıkların patofizyolojisinin aydınlatılması ve hatta normal insan gelişim biyolojisi ile ilgili bilinmeyenlerin açığa çıkması açısından oldukça önemlidir. Hastalıkla ilgili genlerin tanımlanması, genlerin kromozomlar üzerindeki lokalizasyonlarının tanımlanması çeşitli genetik haritalama metodları ile mümkündür. Bu sayede hastalığın gelişiminde rol oynayan biyolojik yollar aydınlatılabilecek, ürogenital sistem ile ilgili hastalıkların anlaşılmasına yol açılabilecektir. Mülleryan aplazinin genetik etiolojisini aydınlatmada bu methodlara başvurulmasını kısıtlayan tek durum olguları nadir olması değildir. Bu olguların

tamamına yakınının sporadik olması ve bir infertilite hastalığı olması dolayısıyla olguların oğul döl verememesidir. Bu durum hastalığın kalıtım paterninin belirlenmesinde de zorluk yaratmaktadır.

Mülleryan aplazi çalışmalarının kısıtlamaları göz önünde bulundurulduğunda, tüm genomu hedef alan hasta-kontrol çalışmaları, bu tür hastalıklar için öncelikli dizayn edilmektedir. Tüm genomu bir baz değişimine kadar tarayabilen hızlı ve etkin metodlar, teknolojinin gelişmesiyle beraber araştırmalardaki yerini almıştır. Yeni nesil dizileme tekniği, bu metodların başlarında gelmektedir. Ancak hala pahalı olup, ülkemiz içinse henüz yeni bir metoddur.

Genomik çalışmaların hızla devam ettiği bu dönemde araştırma projemiz uterus ve vajenin gelişimsel abnormalitelerinin moleküler patogenezinin aydınlatılmasına katkı sağlaması açısından oldukça önemlidir. İlgili genlerin tanımlanması ile kesin tanı, genetik risklerin ve genetik heterojenliğin daha iyi değerlendirilmesi ve tedavilerin geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Ülkemizde bu değerli nadir görülen olguları kapsayan genetik bir çalışma bugüne kadar yapılmamıştır. Araştırma projemiz doğuştan gelişimsel hasarların genetiği üzerine dayalı özgün bir tez olup, ülkemizde bu alanda yapılmış olan ilk çalışmadır.

BİREYLER VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran ve Mülleryan aplazi tanısı almış 66 olgu ve ulaşılabilen aile bireyleri çalışma kapsamına alınmıştır. Çalışmanın gerçekleştirilmesi için; Akdeniz Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (19.03.2012 - 04/42 sayılı karar) ve T.C. Sağlık Bakanlığı İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (04.03.2013 - 23 sayılı karar) onay alınmıştır. Gönüllülük esasına göre aydınlatılmış onay formu imzalatılan hasta olgular ve aile bireyleri çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1. Mülleryan Aplazi Tanısı Almış Olgularda Klinik İnceleme

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Polikliniği'ne primer amenore ya da infertilite şikayeti ile başvuran hastaların muayenesini takiben, Ultrasonografi (USG) ya da Manyetik Rezonans görüntüleme teknikleri ile Mülleryan aplazi tanıları kondu. Mülleryan aplaziye en sıklıkla eşlik eden renal anomalilerin varlığı, üriner USG ya da intravenöz pyelografi (IVP) ile araştırıldı. Kardiyak, iskeletsel, işitsel ve diğer anomalilerin varlığı, hasta bireylere sorularak kaydedildi. Hastaların serum, Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH), Lüteinizan Hormon (LH), Östradiol (E2), Prolaktin (PRL), Tiroid Stimüle Edici Hormon (TSH) düzeyleri belirlendi. Elde edilen klinik veriler, Ek-1'de sunulan "Klinik İnceleme Formu"na işlendi ve arşivlendi.

3.2. Periferik Kan ve Tükürük Örneklerinin Alımı

Mülleryan aplazi tanısı almış olgular ve olguların hastanemize gelebilen aile bireyleri, gönüllülük esasına göre aydınlatılmış onam formu imzalatılarak çalışmaya dahil edildi. Periferik kan örnekleri moleküler genetik analizler için 6 ml olacak şekilde K₃EDTA'lı steril tüplere [Venoject®], sitogenetik analizler için 2 ml kan heparinize enjektörlere alındı. Moleküler genetik analizler için alınan kanlar, DNA izolasyonu işlemine kadar +4 °C'de saklandı. Sitogenetik analizler için alınan kanlar ise bekletilmeden, aynı gün işleme alındı.

Olguların aile bireylerinin Antalya dışında yaşamaları durumunda tükürük örneği gönderilmesi istendi. 50 ml'lik falkon tüp gönderilen aile bireyleri, dişlerini fırçaladıktan ve ağızlarını su ile çalkaladıktan sonra falkon tüp içerisine ağız dolusu 3 kez tükürdükten sonra tüpleri imzaladıkları aydınlatılmış onam formları ile beraber laboratuvarımıza gönderdiler.

3.3. Periferal Kandan Genomik DNA Eldesi

Olguların genomik DNA'ları, periferal kandan modifiye non-enzimatik metod ile izole edildi. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler ve işlem basamakları aşağıdaki gibi uygulandı.

3.3.1. Kullanılan Solüsyonlar

CLB 1X (Hücre Liziz Tamponu)

0.32 M Sükroz	(Merck)
10mM Tris HCl pH 7.6	(Sigma)
5mM MgCl ₂	(Merck)
%1 Triton-X	(Sigma)

Yukarıdaki derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan CLB 1X tampon otoklavda sterilize edildikten sonra +4 °C'de saklandı.

TKM1 (Düşük Konsantrasyonlu Tuz Solüsyonu)

10mM Tris HCl pH 7.6	(Sigma)
10mM KCl	(Reidel-de Haen)
10mM MgCl ₂	(Merck)
2 mM EDTA pH 8.0	(Sigma)

Yukarıdaki derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan TKM1 tamponu otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

TKM2 (Yüksek Konsantrasyonlu Tuz Solüsyonu)

10mM Tris HCl pH 7.6	(Sigma)
10mM KCl	(Reidel-de Haen)
10mM MgCl ₂	(Merck)
0.4mM NaCl	(Carlo Erba)
2 mM EDTA pH 8.0	(Sigma)

Yukarıdaki derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan TKM2 tamponu otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

%10 SDS Çözeltisi

1 gram SDS (Q-Bio gene) 10ml distile suda çözüldükten sonra filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

6 M NaCl

35.06 gram NaCl (Carlo Erba) 100 ml distile suda çözülerek otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

%70'lik Etanol

70 ml %99'luk etanol, 30 ml distile su ile karıştırıldı ve +4 °C'de saklandı.

3.3.2. İşlemler

K₃EDTA'lı steril tüplere alınan kan alt üst edilerek homojenize edildi. Kan örneğinden 3 ml alınarak 15 ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 3 katı hacim kadar CLB 1X eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Oda sıcaklığında devir sayısı (rpm) dakikada 2200 olacak şekilde 10 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldı. Çökelti elle vurularak homojenize edildikten sonra üzerine 5 ml TKM1 solüsyonundan eklendi. Vorteksle karıştırılarak homojenize edildikten sonra oda sıcaklığında 2200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldı. Çökelti elle vurularak homojenize edildikten sonra üzerine 1.5 ml TKM2 ve 100µl %10 SDS solüsyonlarından eklendi. Tüp alt üst edilerek karışması sağlandı. Çökelti tamamen homojenize olana kadar 65 °C'de 30-60 dakika süreyle su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra tüpe 570 µl 6 M'lık NaCl eklendi. Beyaz köpüklü bir görünüm elde edene kadar vorteksle karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2900 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Dökelti içinde 4.5 ml %99 etanol bulunan 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Tüp alt üst edilerek DNA'nın kondanase olması sağlandı. Tüp 2900 rpm'de santrifüj edildi. Dökelti atıldı. Çökelti üzerine 5 ml %70'lik etanol ilave edilerek DNA'nın yıkanması sağlandı. Oda sıcaklığında 2900 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek dökelti atıldı. Tüp içerisinde çökelti halinde bulunan DNA 10-15 dakika kurutuldu. Üzerine 300 µl Tris EDTA eklendi ve etüvde 65 °C'de 1 saat veya 4 °C'de gece boyu bırakılarak DNA'nın çözülmesi sağlandı. Çözünen DNA 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Elde edilen DNA örneklerinin optik dansite ölçümleri spektrofotometre ile yapıldıktan sonra, sulandırılıp uzun süreli -20 °C'de, kısa süreli +4 °C'de saklandı.

3.4. Tükürük Örneğinden Genomik DNA Eldesi

Aile bireylerine ait tükürük örneklerinden manuel yöntem ile genomik DNA izolasyonu yapıldı.

3.4.1. Kullanılan Solüsyonlar

Saliva Lizis Tamponu

50 mM Tris (pH:8)	(Sigma)
10 mM EDTA	(Sigma)
%2 SDS	(Q-Biogene)

Yukarıdaki derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan Saliva Lizis Tamponu otoklavda sterilize edildikten sonra +4 °C'de saklandı.

4.5 M NaCl

65.745 gram NaCl (Carlo Erba) 1000 ml distile suda çözülerek otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

%70'lik Etanol

70 ml %99'luk etanol, 30 ml distile su ile karıştırıldı ve +4 °C'de saklandı.

3.4.2. İşlemler

Tükürük örneği 15 ml'lik falkon tüpe alındı. 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Çökelti üzerine 3 ml Saliva Lisis Tamponu ve 15 µl Proteinaz K eklendi. 65 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. Karışım üzerine 1 ml 4.5 M NaCl eklendi. 10 saniye vorteks aracılığıyla karıştırıldı. 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Çökelti kaldırılmadan dökelti temiz bir tüpe alındı. Tüpün kenarından sızdırılarak 6 ml soğuk %99'luk etanol eklendi. 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Dökelti uzaklaştırıldı. Çökelti halinde bulunan DNA üzerine 500 µl %70'lik etanol eklenip, kısa süreli santrifüj uygulandı. Santrifüjden sonra etanol uzaklaştırılıp, tüp 37 °C'lik etüv içerisinde kapağı açık bir şekilde 10 dakika bekletilerek, kalan etanolün uçması sağlandı. Daha sonra genomik DNA sulandırılıp uzun süreli -20 °C'de, kısa süreli +4 °C'de saklandı.

3.5. DNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü

İzole edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık derecelerini belirlemek için spektrofotometre ile ölçümler yapıldı. Nanodrop aracılığıyla örnekten alınan 1 µl numune içerisindeki genomik DNA miktarı nanogram (ng) cinsinden tayin edildi. OD260/OD280 oranı yaklaşık 1.8 olan örnekler ileri moleküler genetik deneylerde kullanıldı.

3.6. Periferik Kandan Kromozom Eldesi ve Analizi

Mülleryan aplazi tanısı almış olguların, kısa süreli lenfosit kültürü ile elde edilen kromozomları sitogenetik olarak analiz edilerek, kromozomal abnormalite açısından incelendi.

3.6.1. Lenfosit Kültürü İçin Kullanılan Besi Ortamının Hazırlanması

Ticari olarak satılan steril 100 ml'lik besi ortamına (RPMI 1640) (Biochrom) steril koşullar altında aşağıdaki maddelerden belirtilen oranlarda eklendi:

20 ml Fötal dana serumu	(Biochrom)
1 ml L-Glutamin	(Biochrom)
1 ml Penisilin-Streptomisin karışımı	(Biochrom)

Fötal dana serumu, L-Glutamin, Penisilin-Streptomisin eklenen besiyeri, 10 ml'lik steril vidalı kapaklı tüplere 3 ml olacak şekilde bölündü.

3 ml besiyeri üzerine 75 µl Fitohemaglutinin (Biological Industries) ve enjektör ile 15 damla Timidin (Ambresco) eklendi.

3.6.2. Ekim

3 ml besiyeri bulunan steril kültür tüpe 6-8 damla heparinize edilmiş periferik kan damlatıldı. Vidalı kapaklı tüpler kapatıldı ve yavaşça karıştırıldı. Tüpler yan yatırılarak, 37°C etüvde 72 saat inkübe edildi.

3.6.3. Metafazların Elde Edilmesi (Harvest)

68'inci saatte Timidin uzaklaştırıldı: Kültür tüpü, 7 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilerek dökelti (süpernatant) atıldı, çökelti (pelet) üzerine 3 ml hazır besiyeri (Fötal dana serumu, L-Glutamin, Penisilin-Streptomisin içeren) eklendi. Kültür tüpü 37°C etüve geri kondu. 69.5'inci saatte, kültür tüpüne 0.1 ml CRA (Chromosome Resolution Additive; kromozom ayrışımını arttırıcı) (Genial Genetics) eklendi. Kültür tüpü 37°C etüve geri kaldırıldı. 71'inci saatte, tüpe 0.1 ml MAS (Metaphase Arresting Solution; metafaz bloke edici solüsyon) (Genial Genetics) eklendi.

Süre sonunda (72. saatte) kültür tüpü 2000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldı. Üzerine 6 ml hipotonik solüsyonu (0.075 M KCl) (Merck), vorteks cihazı yardımıyla karıştırılarak eklendi. 37°C etüvde 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, tüp vorteks ile karıştırılırken içerisine 0.5 ml yeni hazırlanmış, 3:1 oranında metanol (Merck) ve glasiyel asetik asit (Merck) karışımından oluşan fiksatif solüsyonu eklendi. Tüp 2000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Dökelti uzaklaştırıldı. Çökelti elle yavaşça karıştırıldı. Üzerine 5 ml fiksatif solüsyonu vortekslenerek ilave edildi. Daha sonra tüp, 2000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Fiksatif solüsyonu ile yapılan bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Üçüncü fiksatif solüsyonu eklenen tüp, -20 °C'de 10 dakika bekletildi. Süre sonunda, 2000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilerek yayma için kullanılacak olan çökelti elde edildi.

3.6.4. Yayma

Santrifüj tüpündeki çökelti üzerinde 0.5 ml fiksatif kalacak şekilde üst kısım atıldı. Çökelti iyice karıştırıldı. Çökelti çok yoğun ise, 1:1 oranında metanol ve glasiyel asetik asitten oluşan fiksatif solüsyonu ile dilüe edildi. Uygun şartlarda (ortalama % 45-50 oranında nem ve 25°C sıcaklık) çökeltiden pastör pipeti yardımıyla bir damla alınarak nefesle yüzeyi nemlendirilmiş lamlara (distile su içinde +4°C'de bekletilmiş) yayma yapıldı. Mikroskobun diyaframı kapatılarak 10X objektifte metafaz sıklığı ve kalitesi kontrol edildi. Yayma yapılan preparatlar, 37°C'de üç gün ya da 60°C' de bir gece yaşlandırıldı.

3.6.5. GTG (G banding by Tripsin using Giemsa) Bantlama

Yaşlandırılmış kromozomların bantlanmasında aşağıdaki solüsyonlar kullanıldı:

Tripsin Solüsyonu:

1.2 gr tripsin (Ambresco), 100 ml KH₂PO₄ (Merck) solüsyonu içerisinde çözülde.

Giemsa Boyası için kullanılan Sörensan Tamponu :

KH_2PO_4 solüsyonu: 9.08 gr KH_2PO_4 , 1000 ml bdH_2O içerisinde çözöldü. pH:7.00'ye ayarlandı. +4 °C'de saklandı.

Na_2HPO_4 solüsyonu: 11.88 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 1000 ml bdH_2O içerisinde çözöldü. pH:7.00'ye ayarlandı. +4 °C'de saklandı.

Sörensan Tamponu: Aynı hacimde KH_2PO_4 solüsyonu ve Na_2HPO_4 solüsyonu karıştırıldı. +4 °C'de saklandı.

100 ml'lik Sörensan solüsyonu hazırlandıktan sonra karışımdan 4,5 ml alınıp atıldı ve 4,5 ml Giemsa boyası (Merck) eklenerek %4,5' luk Giemsa solüsyonu hazırlandı. Yaşlandırılmış olan preparatlar, 32°C'ye ayarlanan %0.2'lik tripsin solüsyonu ile 1-2 dakika muamele edildi. Süre sonunda preparatlar musluk suyundan geçirildi. Preparatlar oda ısısında tutulan ve taze hazırlanan %4,5'luk Giemsa boyası içerisinde 5-6 dakika bekletildi. Boyadan çıkarılan preparatlar akan musluk suyundan geçirildi. Kurutma kağıdı arasında kurutuldu, mikroskopta 100X objektif ile band alınıp alınmadığı kontrol edildi. 100X objektifte kontrol edebilmek için preparatların üzerine immersiyon yağı damlatıldığından, preparatların bu yağdan arınabilmesi için 15 dakika Ksilol (Merck) içinde tutuldu. Preparatlar entellan (Merck) kullanılarak, lamelle kapatıldı.

3.6.6. Analiz

GTG yöntemi ile bantlanmış minimum 500 bant çözünürlüğündeki metafaz kromozomları, mikroskopta 100X objektif ile immersiyon yağı kullanılarak belirlenip, bilgisayar yardımıyla karyogramı hazırlanarak analiz edildi. Herhangi bir kromozomal abnormalite görölen bireylerde analiz edilen metafaz sayısı 100'e çıkartılarak sonuç elde edildi. GTG bantlama ile 1, 9, 16 nolu kromozomlarda heterokromatin bölge artışı ya da azalışı, D (13, 14, 15) ve G grubu (21, 22) kromozomlardaki satellit kopya sayılarında bir değişimden şüphelenildi ise, C-bands by Barium hydroxide using Giemsa (CBG) ve Nucleolar Organizing Regions teknikleri uygulandı.

3.6.7. CBG Bantlama

Kullanılan Solüsyonlar

%5'lik $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Merck
0.2 N HCl	Merck
2xSSC: (1:1 oranında 0.3 M NaCl ve 0.03 M Sodyum Sitrat)	Merck
%4.5 Giemsa	Merck

Taze yayılmış preparat kullanıldı. Su banyosu yardımıyla, HCl ve 2xSSC solüsyonları 60 °C'ye ısıtıldı. Preparat HCl solüsyonunda 1 dakika bekletildikten sonra

çeşme suyunda yıkandı. Oda ısısında 7 dakika Baryum solüsyonunda bekletildi, çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra preparat, 2xSSC solüsyonu içerisinde 30 dakika bekletildi. Süre sonunda direkt %4.5'lik Giemsa boyasında 15-20 dakika boyandı. Hazır hale gelen preparatlar, mikroskopta analiz edildi.

3.6.8. NOR Bantlama

Preparat fiksatiften geçirildi, çeşme suyunda yıkandı ve Whatman kağıdı ile kurutuldu. Bir tüp içerisinde 1 damla jel ve 3 damla %50 lik Gümüş Nitrat (AgNO_3) (Sigma) konuldu ve pastör pipeti yardımıyla karıştırıldı. Karışım preparatın üzerine damlatıldı, üzerine lamel kapatıldı. Preparat 70 °C'deki ısıtıcının üzerine konuldu. Sarı renk oluşunca alınıp çeşme suyunda yıkandı. 4 dakika %4.5'lik Giemsa boyası ile boyandı. Çeşme suyu ile fazla boya arındırıldı. Üzerine 1 damla su damlatılıp lamel ile kapatıldı. Mikroskop altında analiz edildi.

3.7. Kopya Sayısı Varyasyonları (CNV) Analizi

CNV analizi, tez çalışması bütçesinin kısıtlı olması nedeniyle yalnızca 19 olguda gerçekleştirildi. 19 olgudan 8'ini, parental akraba evliliği olan bireyler oluşturdu. Parental akraba evliliği olan olguların seçilme amacı, hastalıkla ilişkili olabilecek resesif genleri içerme olasılığı olan, heterozigosite kaybı (Loss of heterozygosity/LOH) ya da homozigot olan genomik bölgeleri diğer olgulara göre daha yaygın taşıma potansiyelleri idi. 19 olgudan birinin halasında Mülleryan aplazi şüphesi bulunması, dolayısıyla ailesel vaka olabilme olasılığı nedeniyle CNV analizi yapıldı. Diğer 10 olgu ise rastgele seçildi. Tüm genom CNV analizi, 750.000 SNP, 1.9 milyon CGH probu içeren Affymetrix Cytoscan HD mikrodizin platformunda gerçekleştirildi. DNA örneklerinin hazırlanması CytoScan® HD Array Kit ve Reaktif Kiti Paketinin kullanıldığı, pozitif kontrol dahil 16 örnek için düzenlenmiş aşağıdaki protokol takip edilerek hazırlandı.

Islak laboratuvar aşaması olarak da tanımlanan, CNV analizi aşamasından önceki genomik DNA örneklerinin hazırlanma aşamaları başlıca, enzimatik kesim, ligasyon, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) amplifikasyonu, PZR ürünü kontrolü, PZR ürünü pürifikasyonu, pürifikasyon ürünü miktar tayini, fragmentasyon, fragmente edilen örneklerin jel kontrolü, işaretleme, hibridizasyon ve yıkama, boyama, tarama basamaklarından oluşmaktadır. Daha sonra bilgisayar aracılığıyla CYCHP dosyasına çevrilen tarama verileri analiz edilmektedir.

3.7.1. Enzimatik Kesim

96 kuyucuklu plakanın 15 kuyucuğuna 5'er µl (50 ng/µl) hasta gDNA'sı, 16. kuyucuğa kit içerisinde bulunan pozitif kontrol gDNA'sı eklendi. Negatif kontrol olarak 5µl düşük etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) konsantrasyonuna sahip Tris EDTA (TE) solüsyonu başka bir kuyucuğa eklendi. 10X Nsp I restriksiyon enzimi tamponu ve 100X BSA (Bovin Serum Albumin) oda sıcaklığında çözdürüldü.

Vortekslendikten sonra spin yapıldı ve ardından buz üzerine konuldu. Enzimatik kesim için bir kuyucuk başına toplam miktar 14,75 µl olacak şekilde 16 kuyucuk için Affymetrix® Nükleaz-Free Su, 10X Nsp1 Tamponu, 100X BSA, Nsp1 enzimini uygun konsantrasyonlarda içeren karışım hazırlandı. Hazırlanan karışım her biri 1 saniye olacak şekilde yüksek hızda 3 kere vortekslendi ve spin yapıldı. Karışımdan örneklerin üzerine 14.75 µl eklendi.

PZR cihazının kapağı önceden ısıtıldı. Plaka yapışkan film ile kapatıldı. Plakanın 4 köşesi ve ortası yüksek hızda vortekslendi. 2000 rpm'de 1 dakika spin yapıldı. Plaka PZR cihazına yerleştirildi ve aşağıda gösterilen *CytoScan Digest* programı (37 °C'de 2 saat, 65 °C'de 20 dakika, 4 °C bekleme) uygulandı.

3.7.2. Ligasyon

10X T4 DNA Ligaz Tamponu ve 50 µM Adaptör, Nsp 1 oda sıcaklığında çözündürüldü. Çözünmeyen partikül kalmaması için vortekslendi ve buz üzerine koyuldu. 10X T4 DNA Ligaz Tamponu, 50 µM Adaptör, T4 DNA Ligaz içeren karışım hazırlandı. Karışım, her biri 1 saniye olacak şekilde yüksek hızda 3 kere vortekslendi ve spin edildi. Hazırlanan karışımdan, enzim kesimi aşamasında miktarı 19.75 µl'ye ulaşan örneklerin üzerine 5.25 µl eklendi. Toplam hacim 25 µl oldu. Plaka yapışkan film ile kapatıldı. Plakanın 4 köşesi ve ortası yüksek hızda vortekslendi. 2000 rpm'de 1 dakika spin edildi. Plaka, PZR cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki *CytoScan Ligate* programı (16 °C'de 3 saat, 70 °C'de 20 dakika, 4 °C bekleme) uygulandı.

3.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Amplifikasyonu

Plaka, 2000 rpm'de 1 dakika spin edildi. Toplam 25 µl'ye ulaşmış örnekler üzerine 75 µl soğuk Affymetrix® Nükleaz-free su eklenerek dilüsyon yapıldı. Plaka yapışkan film ile kapatıldı. Plakanın 4 köşesi ve ortası yüksek hızda vortekslendi. 2000 rpm'de 1 dakika spin edildi. Her örnekten 10 µl başka bir PZR plakasına aktarıldı. 10X TITANIUM *Taq* PZR tamponu, dNTP karışımı ve PZR primeri 002 oda sıcaklığında çözündürüldü. Vortekslenip spin yapıldı ve buz üzerine konuldu. 50X TITANIUM *Taq* DNA Polimeraz, GC-Melt Reaktif ve Affymetrix® nükleaz-free su da buz üzerine alındı. 50 ml'lik bir santrifüj tüpüne 16 örnek için Soğuk Affymetrix® Nükleaz-Free Su, 10X TITANIUM™ *Taq* PZR Tamponu, GC-Melt Reaktif, dNTP Karışımı, PCR Primer 002, 50X TITANIUM™ *Taq* DNA Polimeraz içeren karışım hazırlandı. PZR karışımı, yüksek hızda, her seferinde 1 saniye olacak şekilde 3 kez vortekslendi. Karışımdan 90 µl örneklerin üzerine eklendi. Toplam hacim 100 µl'ye ulaştı. Plakanın 4 köşesi ve ortası yüksek hızda vortekslendi. 2000 rpm'de 1 dakika spin edildi.

Plaka buz üzerinde Post-PZR çalışma alanına taşındı. PZR cihazının kapağı önceden ısıtıldı. Plaka cihaza yerleştirildi ve CytoScan PZR programı (94 °C'de 3 dakika ilk

denatürasyon, 30 döngü: 94 °C’de 30 saniye, 60 °C’de 45 saniye, 68 °C’de 15 saniye, son uzama 68 °C’de 7 dakika, 4 °C’de bekleme) uygulandı.

3.7.4. PZR Ürünü Kontrolü

5 µl Affymetrix nükleaz-free su ve 2 µl USB 5X RapidRun™ yükleme boyası plakanın 16 kuyucuğuna konuldu. Her PZR ürününden 3 µl, karışım üzerine eklendi, kapatıldı. Vortekslenip spin yapıldı. Örnek karışımından 8 µl alınıp %2’lik agaroz jele yüklendi. Örneklerin önündeki ve sonundaki kuyucuklara 5 µl USB 50-2000 bç marker konuldu. Jel 5V/cm voltajda, 45 dakika yürütüldü. Örnekler, 150-2000 bç arasında smear görüntüsüne sahip olmaları açısından kontrol edildi.

3.7.5. PZR Ürünü Pürifikasyonu

Her bir örnek için kalan PZR ürünü, uygun şekilde işaretlenmiş 1.5 ml kilitli güvenli kapaklı ependorf tüp içine alındı. Her örneğin üzerine homojenize edilmiş, 720 µl “Pürifikasyon Bead” eklendi. Tüpler dikkatli bir şekilde kapatıldı ve ters düz yapılarak karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Tüpler, kapak-tüp bağlantı noktaları dışarıya bakacak şekilde maksimum hızda (21.130 rcf) 3 dakika santrifüj edildi. Daha sonra, tüpler bir manyetik karıştırıcının üzerine kondu (MagnaRack™). Tüplerin dibindeki Bead pelletine dokunmadan dökelti alınıp atıldı. Her bir tüpe 1.0 ml Pürifikasyon Yıkama Tamponu eklendi. Tüpler kapatılarak maksimum hızda 2 dakika vortekslendi. Kapak bağlantı kısımları dışarıya bakacak şekilde maksimum hızda (21,130 rcf) 3 dakika santrifüj edildi. Tüpler manyetik karıştırıcıya geri kondu. Bead pelletine dokunmadan supernatant alındı ve atıldı. 16,100 rcf’de 30 saniye spin yapıldı. Ardından manyetik karıştırıcıya geri koyuldu. Pipet yardımıyla, her bir tüpün dibinde kalan Pürifikasyon Yıkama Tamponu temizlendi. Manyetik karıştırıcı üzerinden alınan tüplerin kapakları açık bırakılarak kalan Pürifikasyon Yıkama Tamponunun uçması sağlandı (10 dakika). Süre sonunda her bir tüpe, 52 µl Elüsyon Tamponu doğrudan beadlerin üzerine eklendi. Maksimum güçte 10 dakika vortekslenerek, beadler tekrar süspansiyon haline getirildi. Eğer tam olarak çözünmedi ise tüplere el ile vurulup, 2 dakika daha vortekslendi. 21.130 rcf ‘de 3 dakika santrifüj edildi. 10 dakika manyetik karıştırıcı üzerinde beadler kenarlara tutunana kadar bekletildi. Beadlerden ayrılmış 47 µl örnek, 96 kuyucuklu plakaya aktarıldı. Plakanın üzeri kapatıldı, 1 saniye yüksek hızda vortekslendi. 2000 rpm’de 1 dakika spin edildi.

3.7.6. Pürifikasyon Ürünü Miktar Tayini

96 kuyucuklu plakanın 16 kuyucuğuna 18 µl Affymetrix nükleaz-free su kondu. Pürifiye edilen her örnekten 2 µl eklendi. Plaka kapatılıp, vortekslendi ve spin edildi. Affymetrix nükleaz-free su kullanılarak Nanodrop Optik Dansite (OD) ölçüm değeri sıfırlandı. Seyreltilmiş her örnekten 2 µl alınarak 260, 280 ve 320 nm OD değerleri ölçüldü. Her bir örnek için seyreltilmemiş konsantrasyon µg/µl cinsinden: (ng/µl cinsinden örnek konsantrasyonu X 10) ÷ 1000 formülüyle hesaplandı.

OD Değerlerinin Değerlendirilmesi:

Yedi veya daha fazla örnek için pürifikasyon verimi en az $\geq 3.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ olmalıdır. Verim $< 2.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ olan örnekler için deneye devam edilememektedir. OD260/OD280 oranının 1.8 and 2.0 arasında olması idealdir. OD320 değeri ise sıfıra çok yakın olmalıdır. (< 0.1).

3.7.7. Fragmentasyon

Fragmentasyon aşamasına geçilmeden önce, plaka santrifüjü $+4^\circ\text{C}$ 'ye getirildi. Kapağının ısınması için PZR cihazı açıldı. Saflaştırılan ve miktar tayini yapılan örnekler -20°C 'den çıkarılıp ve çözündürüldü. Plaka iyice kapatılıp vortekslendi ve spin edildi. Soğuması için buz üzerinde 10 dakika bekletildi. (Su dahil bütün solüsyonlar buz üzerinde bekletildi. Bütün eklemeler buz üzerinde yapıldı.) Fragmentasyon karışımı; Soğuk Affymetrix® Nükleaz-Free Su, 10X Fragmentasyon Tamponu, Fragmentasyon Solüsyonu (DNaz içerir) uygun miktarlarda karıştırılarak hazırlandı. Fragmentasyon karışımı, maksimum hızda her biri 1 saniye olacak şekilde 3 kez vortekslendi. $10 \mu\text{l}$ Fragmentasyon karışımı, her bir örneğin üzerine eklendi ($45 \mu\text{l}$ pürifiye PCR ürünü + $10 \mu\text{l}$ Fragmentasyon karışımı). Plaka yapışkan film ile kapatıldı, yüksek hızda vortekslendi. Soğuk santrifüjde 2000 rpm 'de 1 dakika spin edildi. Plaka PZR cihazına kondu ve *CytoScan Fragment* programı 37°C 'de 35 dakika, 95°C 'de 15 dakika, 4°C 'de bekleme) uygulandı.

3.7.8. Fragmente Edilen Örneklerin Jel Kontrolü

Fragmente olan her bir örnekten $4 \mu\text{l}$ alınıp strip tüplere aktarıldı. Her bir tüpe $16 \mu\text{l}$ Affymetrix nükleaz-free su eklendi. Strip vortekslendi ve spin yapıldı. Her bir karışımdan $8 \mu\text{l}$ alındı ve yeni strip tüplere kondu. $2 \mu\text{l}$ USB 5X RapidRun™ Yükleme Boyası eklendi. Tüpler vortekslendi ve spin edildi. Her bir örnekten $8 \mu\text{l}$, % 4'lük nusieve agaroz jele yüklendi. Örneklerin öncesi ve sonrası kuyucuklara, $2 \mu\text{l}$ TrackIt™ 25 bp DNA marker bırakıldı. Jel, $5\text{V}/\text{cm}$ güçte 45 dakika yürütüldü. Jel incelendi, örneklerin 25-125 bp arasında smear halinde görüldüğü tespit edildi.

3.7.9. İşaretleme

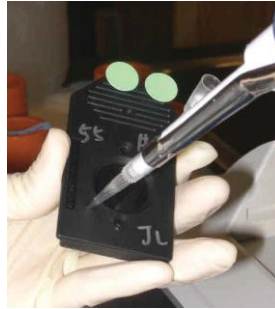
5X TdT (Terminal Deoksi Nükleodil Transferaz) Tamponu ve 30 mM DNA işaretleme solüsyonu oda sıcaklığında çözündürüldü ve buz üzerine kondu. Uygun konsantrasyonlarda 5X TdT Tamponu, 30 mM DNA İşaretleme Solüsyonu, TdT Enziminden oluşan, 16 örneklik işaretleme karışımı hazırlandı.

96 kuyucuklu plaka içerisindeki her bir örneğin üzerine $19.5 \mu\text{l}$ işaretleme karışımından eklendi ($51 \mu\text{l}$ fragmente örnek + $19.5 \mu\text{l}$ işaretleme karışımı). Plaka vortekslenip, spin edildi. Plaka PZR cihazına yerleştirildi ve *CytoScan işaretleme* programı (37°C 'de 4 saat, 95°C 'de 15 dakika, 4°C 'de bekleme) uygulandı.

3.7.10. Hibridizasyon

Kullanmadan önce çipler/“array”ler paketlerinden çıkarıldı ve +4 °C’de 1 saat bekletildi. Hibridizasyon fırınları, rotasyon özelliği açık olacak şekilde 1 saat, 50 °C’de ısıtıldı. Bir “Batch Registration” dosyası oluşturuldu. Buz üzerinde 15 ml’lik bir konik tüpte, 16 örneklik, Hibridizasyon Tamponu 1, Hibridizasyon Tamponu 2, Hibridizasyon Tamponu 3, Hibridizasyon Tamponu 4 ve Oligo Kontrol Solüsyonu 0100’den oluşan hibridizasyon karışımı hazırlandı. Karışım her seferinde 3 saniye olmak üzere, 3 kez vorteklenerek iyice karıştırıldı, ardından soğuk blok üzerinde bulunan bir kaba döküldü. Her bir örneğe 190 µl hibridizasyon karışımı eklendi, iyice vortekslenip spin edildi. Plaka PZR cihazına yerleştirildi ve *CytoScan Hyb* programı (95 °C’de 10 dakika, 4 °C’de bekleme) çalıştırıldı.

Yüklemeden önce, örnekler en az 1 dakika 49 °C’de inkübasyona bırakıldı. Çipin üst kısmındaki noktaların (septa) üzerine beyaz yuvarlak yapışkanlar yapıştırıldı. PZR cihazından alınan örnekler, bir çipe 200 µl olacak şekilde Şekil 3.1’de gösterildiği gibi yüklendi. Çip içerisinde hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi.



Şekil 3.1. Örneğin çipe yüklenmesi

Sonrasında, çipler hemen hibridizasyon fırınına konarak 50 °C ve 60 rpm’da, 16 saat hibridize edildi.

3.7.11. Yıkama, Boyama, Tarama

500 µl Boyama Tamponu 1 , 1,5 ml’lik sarı renkli ependorf tüpe, 500 µl Boyama Tamponu 2, renksiz tüpe, 800 µl Array Bekletme Tamponu, mavi renkli tüpe konuldu.

Çiplerin Yıkama ve Boyanması:

Yıkama tamponları ile Fluidik İstasyon yıkandı. Boyama tamponları yüklendi ve uygun Fluidik protokol (*CytoScanHD_Array_450*) seçildi. Fluidik protokolü başlatıldı ve kartuş kolu “eject” pozisyonunda bırakıldı. Beyaz yapışkanlar çıkartılan arrayler (çipler), barkodları okutularak, Fluidik İstasyona yerleştirilerek yıkama gerçekleştirildi. Bir sonraki yıkama işlemi için boyama tamponu 1-2, array bekletme tamponu tekrar hazırlandı.

Tarama işlemi için:

Tarayıcı işlemden 20 dakika önce çalıştırıldı. Pencere kısmında herhangi bir baloncuk görünümü olmamasına dikkat edildi. Array üzerindeki kırmızı renkteki delikler beyaz yapışkanlar ile kapatılıp tarayıcıya koyuldu ve ilgili program aracılığıyla tarama başlatıldı.

3.7.12. Analiz

Her bir örnek için elde edilen CYCHP dosyaları, Affymetrix ChAS 1.2.2 programında açılarak analiz edildi. En az 50 prob ve 100 kb'yi kapsayan DNA amplifikasyonları gerçek kopya sayısı artışı varyasyonu, en az 25 prob ve 100 kb'yi kapsayan delesyonlar ise gerçek kopya sayısı azalışı olarak kabul edildi. Log2 ratio değeri yaklaşık olarak +0.5 olan varyasyonlar heterozigot, +1 olanlar homozigot duplikasyon, yaklaşık -0.5 olanlar heterozigot, -1 olanlar ise homozigot duplikasyon olarak tanımlandı. Kopya sayısı artışları kromozomun yanında mavi, azalışları ise kırmızı olarak saptandı. Tespit edilen CNV'lerin, Database of Genomic Variants (DGV) veritabanı ve Harvard Üniversitesi Children's Hospital verileri ile karşılaştırılarak patolojik ya da benign olma ayrımları değerlendirildi.

3.8. Heterozigosite Kaybı (Loss of Heterozogosity/LOH) Analizi

19 Mülleryan aplazili olgunun genomik DNA örneklerinde, homozigot DNA bölgeleri ve akraba evliliği derecesini belirlemek amacıyla LOH analizi gerçekleştirildi. dokuz olgunun ebeveynlerinin akraba evliliği yaptıkları bilinmekteydi. LOH analizi ile olguların ebeveynlerinin akrabalık dereceleri doğrulandı. Parental akrabalık derecesi, F_{ROH} (ROH: Regions of Homozygosity) değeri olarak adlandırılan homozigosite yüzdesi ile tahmin edildi. F_{ROH} , homozigot otozomal DNA baz dizisi büyüklüğünün, toplam otozomal genom DNA büyüklüğüne oranının yüzdesi olarak hesaplanmaktadır. F_{ROH} değeri Affymetrix Cytoscan HD platformu ile elde edilen data Chromosome Analysis Suite (ChAS) 1.2.2 programı kullanılarak analiz edildi. Bu program ile otomatik olarak hesaplanan ve programda autosomeGenomeLOH (CHP Summary) olarak görünen FROH değerleri belirlendi. En az 5 Mb büyüklüğünde ve 100 ardışık prob içeren homozigot DNA bölgeleri esas alındı. Elde edilen veriler homozigosite haritalaması ön verileridir. Yalnızca hasta genomik DNA materyalinde elde edilmiş bulgulardır. Homozigosite haritalaması çalışmasına, aile bireyleri de dahil edilirse bireyler arasında paylaşılan allelik bölge ya da IBD (Identity by Decsent) segmentinin belirlenmesi mümkün olabilecektir.

Akrabalık derecesini belirlemek için 2013 yılında Sund ve arkadaşlarının yaptığı çalışma referans alındı. Birinci, ikinci, üçüncü ve daha uzak akrabalık derecelerini tahmin etmek için kriter alınan F_{ROH} değerleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir (71).

Tablo 3.1. Akrabalık derecesi tahmini için homozigosite oranları (71)

Akrabalık Derecesi	Teorik Oran	Homozigosite Oranı (Güvenli Aralık)
Birinci ya da daha yakın	>%25	>%28.7
Birinci	%25	%21.3–28.7
Birinci ya da ikinci		%15.3–21.3
İkinci	%12.5	%9.7–15.3
İkinci ya da üçüncü		%8.3–9.7
Üçüncü	%6.25	%4.6–8.3
Üçüncü ya da dördüncü		%4.2–4.6
Dördüncü	%3.125	%2.6–4.2
Dördüncü ya da beşinci		%1.6–2.6
Beşinci	%1.5625	%0.5–1.6

Biyolojik olarak anne-çocuk, baba-çocuk, kardeşler arası yapılan evlilikler birinci derece, amca-yeğen, teyze-yeğen, babaları bir, anneleri ayrı kardeşler arası yapılan (ya da tersi) evlilikler ikinci derece, kuzenler arası yapılan evlilikler üçüncü derece akraba evliliği olarak kabul edilmektedir (72).

3.9. Olası Aday Genlerin Belirlenmesi

Mülleryan aplaziden etkilenmiş bireylerde hedef genlerin dizi analizinin yapıldığı çalışmalar mevcuttur. Ancak belirlenen mutasyonlar henüz hastalığın genetik temellerinin aydınlatılması için yeterli değildir. Bu noktada yeni genlerin hastalıkla ilişkili olabileceği görüşü ortaya atılabilmektedir.

Projemiz, Amerika Birleşik Devletleri, Georgia Tıp Fakültesi'nden Prof Dr. Lawrence C. Layman ve ekibi ile ortaklaşa yürütülmektedir. Dr. Layman'ın Amerikalı Mülleryan aplazili olgulara dair verileri mevcuttur. Tez çalışmamızda, bu verilerin temel alınmasıyla hedeflenmiş, Mülleryan aplazi ile ilişkili olabilecek 12 olası aday genin tüm ekzonik ve ekzonlara yakın intronik bölgelerinin Sanger dizileme tekniği ile dizi analizi yapıldı. 12 olası aday gen, literatür verileri, bir Amerikalı olguda saptanan t(3;16) kromozomal abnormalitesi ve Amerikalı olgularda saptanan bazı CNV'ler baz alınarak belirlendi. Bu bağlamda belirlenen 12 gen; *WNT4*, CCR4-NOT Transkripsiyon Kompleksi, Altünite 10 (*CNOT10*), Tripartite Motif Containing 71, E3 Ubiquitin Protein

Ligaz (*TRIM71*), Çinko Parmak Protein 200 (*ZNF200*), Çinko Parmak Protein 213 (*ZNF213*), Olfaktör reseptör, Aile 1, Altaile F, Üye 1 (*OR1F1*), FAM190A Proteinini (*FAM190A/KIAA1680*), Kondroitin Sülfat Sentaz 3 (*CHSY3*), Lösün zengin tekrarlı Transmembran Nöronal Protein 3 (*LRRTM3*), Katenin Alfa 3 (*CTNNA3*), Hepatosit Nükleer Faktör 1 Beta (*HNF1B*), LIM Homoeobox Protein 1 (*LHX1*) şeklindedir. Literatürde Mülleryan aplazi ile ilişkisi en anlamlı olarak gösterilen gen *WNT4* olması sebebiyle ilk hedef gen olarak belirlenmiştir. Bir Amerikalı olguda 3p22.3 ve 16p13.3 bölgeleri arasında regular bir translokasyon [46,XX,t(3;16)(p22.3;p13.3)] belirlenmiştir. Bu translokasyon dolayısıyla, 3p22.3 kırık noktasında ve yakınında lokalize *CNOT10*, *TRIM71* genleri, 16p13.3 kırık noktasında lokalize *ZNF200*, *ZNF213*, *OR1F1* genleri hedef genler olarak belirlendi. Diğer *KIAA1680/FAM190A*, *CHSY3*, *LRRTM3*, *CTNNA3*, *HNF1B*, *LHX1* genleri sırasıyla CGH-array tekniği ile saptanan 4q22.1dup, 5q23.3dup, 10q21.3del, 17q12del CNV varyasyonlarından yola çıkılarak belirlenmiştir.

3.10. Aday Genlerin Dizi Analizi

Altmış altı Türk Mülleryan aplazili olgunun *HNF1B* ve *LHX1* genleri, 19 olgunun *WNT4*, *TRIM71*, *CTNNA3*, *LRRTM3*, *FAM190A*, *CHSY3* genleri, 16 olgunun ise *CNOT10*, *ZNF200*, *ZNF213*, *OR1F1* genlerinin tüm ekzonları ve ekzona yakın intronik bölgelerinin Sanger dizileme tekniği kullanılarak dizi analizi yapıldı. *HNF1B* ve *LHX1* genlerinde varyasyon taşıyan olguların, ilgili varyasyonlar açısından anne baba ve kardeşlerinin genomik DNA'ları da dizi analizi yapıldı. Ailesel geçiş gösteren ya da *de novo* olan varyasyonlar belirlendi.

3.10.1. Primer Dizaynı

Olası aday genlerin tüm ekzonlarının PZR amplifikasyonu için gerekli primerler Primer 3 programı kullanılarak dizayn edildi.

3.10.2. Olası Aday Genlerin PZR Amplifikasyonu

PZR reaksiyonları, PCR System 9700 (Gene Amp[®]) marka PZR cihazlarında gerçekleştirildi.

3.10.3 PZR Reaksiyonu İçeriği

PZR reaksiyonu içeriği; nükleaz-free, steril H₂O, 10X tampon (Fermentas), MgCl₂ (25 mM) (Fermentas), dNTP (10 mM) Karışımı, İleri ve Geri primer (50 µM), Taq polimeraz (5 u/µl) (Fermentas) ve genomik DNA (100 ng/µl) konularak 50 µl olacak şekilde hazırlandı. Amplikonlar, her bir reaksiyon için uygun PZR programı uygulanarak elde edildi.

3.10.4. PZR Ürünlerinin AgaroZ Jel Elektroförez ile Kontrolü

1.2 gram agaroz (Sigma) tartılarak 100 ml 1XTBE'de (Tris-Borat-EDTA) çözüldü. 50-55 °C'ye gelene kadar soğutuldu. 4 µl etidyum bromür ilave edildi. Elektroförez küvetine taraklar yerleştirilerek sıvı agaroz jel elektroförez küvetine döküldü. Oda sıcaklığında 15-20 dakika polimerize olması için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra taraklar jelden alındı ve agaroz jel, içerisinde 1XTBE bulunan elektroförez tankına yerleştirildi. PCR ürünü ve 50 bç'lik marker yükleme tamponu kullanılarak kuyucuklara mikropipet yardımıyla yüklendi. Elektroförez tankına bağlı güç kaynağı ile 100 voltta 45 dakika yürütüldü. Süre sonunda örnekler UV ısıık veren transilluminatör yardımıyla incelendi.

3.10.5. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

50 µl'lik PZR ürünü 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Üzerine 15 µl, 8 M amonyum asetat ve 500 µl %100 soğuk etanol eklendi. Karışımın alt-üst edilerek karıştırıldı. 10 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda +4 °C'de 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Pipetle dökelti alınarak atıldı. Çökelti üzerine 600 µl %90 etanol ilave edildi. +4 °C'de 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Tekrar dökelti pipetle alınarak atıldı. Tüplerin kapağı 10-15 dakika açık bırakılarak alkolün tamamen uçması sağlandı. Tüpler kuruduktan sonra üzerine 20 µl saf su ilave edildi. 15-30 dakika oda sıcaklığında beklenerek pelletin su içerisinde çözülmesi sağlandı.

3.10.6. DNA Dizi Analizi

Dizi analizi reaksiyonları PCR System 9700 (Gene Amp®) marka Thermal Cycler kullanılarak aşağıdaki programa göre yapıldı.

3.10.6.1. Dizileme Reaksiyonu

5X Tampon, Big Dye v3.1, primer (10 µM), kalıp DNA ve H₂O konularak final hacmi 20µl olacak şekilde hazırlandı.

3.10.6.2. Dizileme PZR Programı

Denatürasyon 96°C'de 10 saniye; birleşme 50°C'de 5 saniye, uzama 60°C'de 4 dakika ve 25 döngü olacak şekilde ayarlandı.

3.10.6.3. Dizi Analizi Yapılacak Amplikonların Saflaştırılması

20 µl'lik ürün üzerine 5 µl 25 mM EDTA ve 60 µl %100 etanol eklendi, kısa süre vortekslenerek karıştırıldı. 5300 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Dökelti pipet

yardımıyla dikkatli bir şekilde alınarak atıldı. Çökelti üzerine 250 µl %70 etanol ilave edildi. +4 °C’de 4000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Tekrar dökelti pipetle alınarak atıldı. Tüplerin kapağı, karanlık bir ortamda 10-15 dakika açık bırakılarak alkolün tamamen uçması sağlandı. Tüpler kuruduktan sonra üzerine 12 µl Hi Di Formamide ilave edildi. Vortekslenerek karıştırıldı. Elde edilen ürün ABI 310 ve ABI 3130 cihazlarına yüklenerek dizilendi.

3.11. İn-Siliko Analiz

Ekzonik dizilerde saptanan yanlış anlamlı nükleotid değişimlerinin patojenite tahminleri, on-line bir in-siliko analiz programı olan Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) (<http://sift.bii.a-star.edu.sg>) programı aracılığıyla gerçekleştirildi.

BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Çalışma kapsamına, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na tanısı konmuş 66 Mülleryan aplazili Türk olgu alınmıştır. Olguların tamamı ASRM sınıflandırmasına göre, 1-e/kombine agenezi (bkz. Şekil 2.4) sınıfında yer almaktadır. Olgular yetişkin bireyler olup, yaşları; 16-48 aralığındadır (25.47 ± 6.9). Olguların anamnezine göre; 11 tanesinde parental akraba evliliği hikayesi mevcuttur (birinci derece kuzen evliliği). 18 olgunun ebeveynlerinin akrabalığı konusunda bilgi edinilememiştir. Olguların ~%97'si sporadik vakalar olup, iki tanesinin ailesel olma şüphesi bulunmaktadır. Bu iki bireyin anamnezine göre olguların halalarında benzer fenotip mevcuttur. Olgulardan sekiz tanesine, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı'na vajinoplasti operasyonu yapılmıştır. 10 olguda Mülleryan aplazi kliniğine renal malformasyonlar eşlik etmektedir. 10 olgudan beşinde unilateral renal agenezi tespit edilmiştir. Bir olguda at nalı böbrek formasyonu saptanmıştır. Diğer olgulardaki renal malformasyonlar; bilateral pelvikaliksiyal dilatasyon, ektopik yerleşimli pelvik böbrek, soliter pelvik böbrek, perimedüller T2 intensite artışı şeklinde belirlenmiştir. Bir olguda skolyoz bulgusu da eşlik etmektedir. Dokuz olguda, şüpheli ya da gerçek ovaryan yapısal ve fonksiyonel abnormaliteler saptanmıştır. Tiroid glandı hipoplazisi, parsiyel empty sella, yarık damak-dudak, bazı olgularda tespit edilen diğer anomalilerdir. Olguların muayene bulguları ve anamnezlerine göre, hiçbirinde kardiyak ve işitme ile ilgili anomali kaydedilmemiştir. Olgulara ait klinik veriler Tablo 4.1'de sunulmuştur.

46 olgunun hormonal tetkikleri (Folikül Stimulan Hormon/FSH, Lüteinizan Hormon/LH, Östradiol/E2, Prolaktin/PRL, Tiroid Stimulan Hormon/TSH, Progesteron/PRG) Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında yapılmıştır. Buna göre altı olgunun FSH değerleri normal değerinden yüksek, 11 olgunun ise normalden düşük bulunmuştur. LH değeri normalden yüksek olan olgu sayısı 12, düşük olan ise altı olarak belirlenmiştir. E2 değeri yüksek 11 olgu varken, düşük altı olgu bulunmaktadır. Altı olgunun PRL değeri yüksek, birinin ise düşük bulunmuştur. TSH yüksekliği olan iki, düşüklüğü olan ise bir olgu bulunmaktadır. PRG değeri yüksek bir, düşük iki olgu belirlenmiştir. Olgulara ait biyokimyasal tetkik verileri Tablo 4.1'de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Mülleryan aplazili olguların klinik ve sitogenetik bulguları

KOD	Karyotip	Renal Anomali	Diğer Anomaliler	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	E2 (pg/ml)	PRL (ng/mL)	TSH (uIU/mL)	PRG (ng/ml)
MA-01	46,XX	Normal	-	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-02	46,XX,13pss	Normal	-	5.51	13.55	68	13.58	1.79	n/a
MA-03	46,XX		-	5.4	4.6	65	6.81	0.5	11.4
MA-04	46,XX	Bilateral Pelvikaliksiyal Dilatasyon	Tiroid Glandı Hipoplazisi	4.3	3.1	23.9	15.8	1.5	0.3
MA-05	46,XX	Sağda Ektopik Yerleşimli Pelvik Böbrek		5.26	22	232.1	16.51	1.1	1.22
MA-06	46,XX			7.4	6.3	7.8	12.8	0.6	n/a
MA-07	46,XX		Fibrotik Bant Şeklinde Over	11.7	15.8	248	n/a	n/a	n/a
MA-08	46,XX			2.9	2.7	n/a	9.9	1.7	n/a
MA-09	46,XX			n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-10	46,XX		-	4.66	11.19	117.9	19.63	2.6	n/a
MA-11	46,XX			n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-12	46,XX			n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-13	46,XX		-	n/a	n/a	n/a	n/a	1.13	n/a
MA-14	46,XX			4.44	n/a	129.9	n/a	n/a	n/a
MA-15	46,XX		-	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-16	46,XX	Unilateral Renal Agenezi		3.3	5.1	158	n/a	1.2	n/a
MA-17	46,XX			n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-18	46,XX	Normal	Fibrotik Bant Şeklinde Over	2.3	5.3	103	99	1.6	4.4
MA-19	46,XX			n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-20	46,XX		-	8.1	7.1	46	7	n/a	n/a
MA-21	46,XX	Normal	Overlerde folikül yokluğu, Parsiyel Empty Sella	1.5	1	11	7.4	2.01	0.77
MA-22	46,XX		USG'de net gözlenemeyen over	5.5	6.5	106	6.1	0.9	0.16
MA-23	46,XX,13pss,21pss			1.4	2.1	274	19	0.2	0.6
MA-24	46,XX			2.88	3.62	246.6	1.79	0.435	n/a
MA-25	46,XX,15pss			15.64	53.2	406.3	n/a	n/a	n/a
MA-26	46,XX			n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-27	46,XX,14pss		-	62	20	4.7	4.8	2.5	0.6
MA-28	46,XX	Normal	Yarı damak-dudak	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-29	46,XX		Hipoplastik sol over	64.1	24.9	70	9.1	2.1	0.41
MA-30	46,XX	Unilateral Renal Agenezi, Soliter pelvik böbrek	-	4.5	5.2	35	15	1.4	n/a
MA-31	46,XX			n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-32	46,XX		Hipoplastik over	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-33	46,XX			6.42	5	23.37	29.15	2.91	0.849
MA-34	46,XX	Normal	-	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-35	46,XX			n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-36	46,XX	Sağ Böbrekte Perimedüller T2 İntensite Artışı	USG'de net gözlenemeyen over	2.9	2.3	91	29	1.2	n/a

K0D	Karyotip	Renal Anomali	Diğer Anomaliler	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	E2 (pg/ml)	PRL (ng/mL)	TSH (uIU/mL)	PRG (ng/ml)
MA-37	46,XX			n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-38	46,XX			6.73	5.68	20.97	13.63	4.45	n/a
MA-39	46,XX,1qh+,16qh+			n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-40	46,XX,21pss	Normal	-	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-41	46,XX	Normal	-	12.69	0.93	968.7	6.95	5.32	0.362
MA-42	46,XX,1qh+			n/a	n/a	n/a	n/a	0.551	n/a
MA-43	46,XX	Normal	USG'de net gözlenemeyen over	3.3	1.32	247.6	15.66	3	n/a
MA-44	46,XX	At nalı böbrek formasyonu		n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-45	46,XX		USG'de net gözlenemeyen over	1.5	0.1	5	5.38	2.81	0.234
MA-46	46,XX	Normal		3.58	4.71	176.8	18.21	1.59	n/a
MA-47	45,X[6]/47,XXX[1]/46,XX [93]		-	22.96	13.75	22.89	7.2	0.089	0.147
MA-48	46,XX	Normal	-	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-49	46,XX,13pss	Normal	-	6.44	8.15	42.06	4.75	n/a	n/a
MA-50	46,XX,9qh+,21pss	Bilateral Pelvikalksiyal Dilatasyon	-	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-51	46,XX	Normal	-	4.86	7.19	76.81	13.16	3.16	n/a
MA-52	46,XX,13pss	Normal	-	8.73	14.74	261.3	43.96	1.17	1.11
MA-53	46,XX	Normal	-	13.25	26.67	311.7	96.63	2.27	n/a
MA-54	46,XX	Unilateral Renal agenezi	-	5.33	7.08	112.8	21.89	1.23	n/a
MA-55	46,XX	Normal	Skolyoz	10.45	58.72	213.9	22.763	0.288	n/a
MA-56	46,XX,14pss	Normal	-	9.95	43.94	194.3	22.27	0.983	n/a
MA-57	46,XX,13pss,22pss	Normal	-	6.72	5.1	57.8	17.95	1.25	n/a
MA-58	46,XX,9qh+	Unilateral Renal agenezi	-	7.59	6.72	37.02	10.34	2.16	n/a
MA-59	46,XX	Normal	-	4.09	6.61	79.68	n/a	n/a	1.17
MA-60	46,XX	Normal	-	7.16	7.6	138.5	9.74	2.15	n/a
MA-61	46,XX	Unilateral Renal agenezi	-	4.1	12.83	54.79	23.37	2.25	n/a
MA-62	46,XX	Normal	-	3.25	2.73	61.19	12.87	2.73	n/a
MA-63	46,XX		-	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
MA-64	46,XX	Normal	-	3.13	3.28	218.4	48.12	1.27	n/a
MA-65	46,XX		-	6.71	6.47	111.3	n/a	n/a	n/a
MA-66	46,XX	Normal	-	3.83	4.08	144.3	13.64	0.868	n/a

n/a: bilgi yok

4.2. Sitogenetik Bulgular

Olguların tamamında (n=66) yapılan sitogenetik analiz sonucu, otozomal kromozomların işe karıştığı herhangi bir kromozomal abnormalite saptanmamıştır. Ancak, MA-47 kodlu hastalarda, mozaik olarak X kromozomu anöploidisi tespit edilmiştir. Bu olgunun analiz edilen 100 metafaz hücresi sonucu, karyotipi; 45,X[6]/47,XXX[1]/46,XX[93] şeklinde belirlenmiştir.

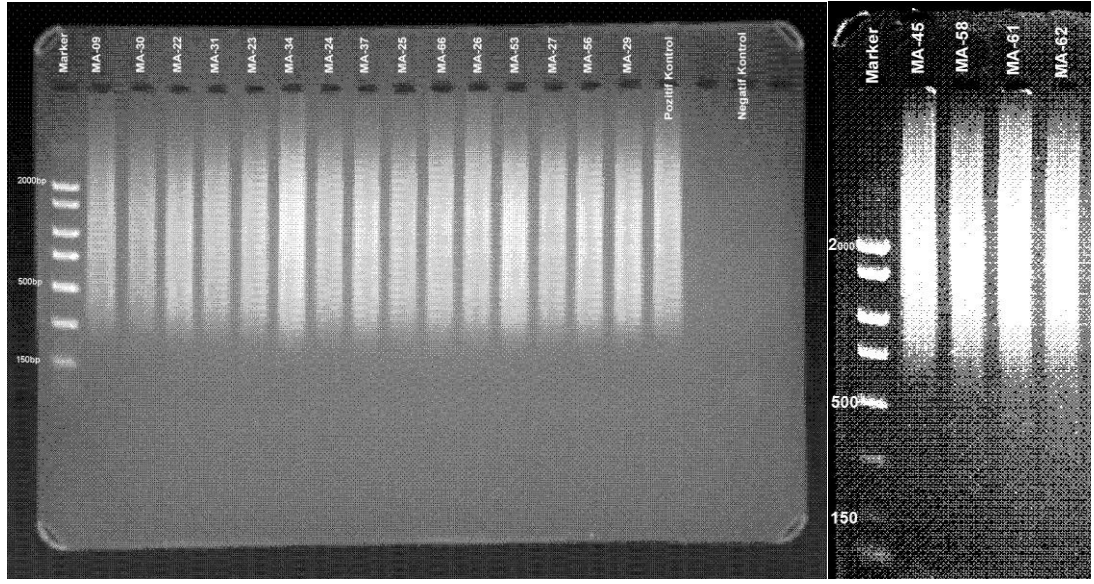
Bu bulgulara ek olarak, CBG analizi ile bazı hastaların 1, 9, 16 nolu kromozomlarının q kollarındaki heterokromatin bölgelerinin amplifikasyonuna bağlı olarak 1qh+, 9qh+, 16qh+ heteromorfizmleri saptanmıştır. Bazı hastalarda ise NOR analizi ile 13, 14, 15, 21 ve 22 nolu kromozomların satellit bölgelerinde, satellit DNA duplikasyonları 13pss, 14pss, 15pss, 21 pss, 22pss olarak belirlenmiştir. Hastaların kromozomal verileri Tablo 4.1’de sunulmuştur.

4.3. Genomik DNA Örneklerinin Hazırlanması ve Kopya Sayısı Varyasyonları Bulguları

Çalışma kapsamındaki 66 Mülleryan aplazili olgunun 19’unda (MA-09, MA-22, MA-23, MA-24, MA-25, MA-26, MA-27, MA-29, MA-30, MA-31, MA-34, MA-37, MA-45, MA-53, MA-56, MA-58, MA-61, MA-62, MA-66) Affymetrix CytoScan HD mikrodizin platformu ile tüm genom CNV analizi yapılmıştır. 19 olgunun genomik DNA örneklerinin saflığı ve miktarı tayin edildikten sonra CNV analizi için DNA örneklerinin hazırlanması aşaması gerçekleştirilmiştir. Islak laboratuvar olarak tanımlanan bu aşamada, adaptör ligasyonunu takiben yapılan PZR amplifikasyonundan ve enzimatik kesim basamaklarından sonra agaroz jel elektroforezi ile kontrol yapılmıştır. İlgili jel kontrol basamakları, Bireyler ve Yöntemler bölümünün; “3.7.4. PZR Ürünü Kontrolü” ve “3.7.8. Fragmente Edilen Örneklerin Jel Kontrolü” başlıkları altında belirtilmiştir.

PZR Ürünü Kontrolü

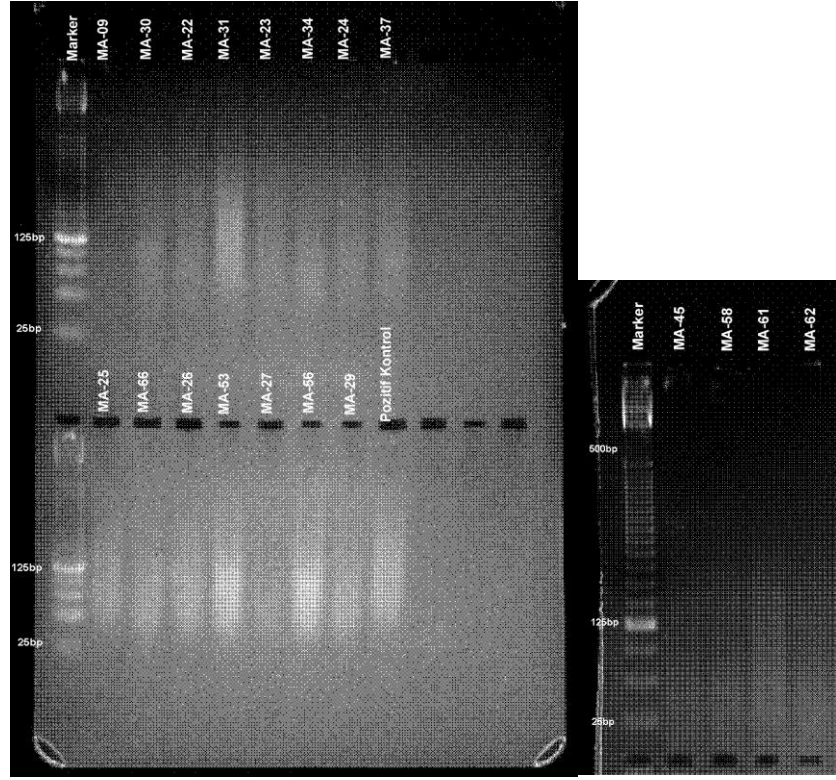
NSP1 enzimi aracılığıyla, konsantrasyonu 50 ng/μl olan 250 ng genomik DNA örneği enzimatik kesime uğratılmıştır. Kırılan DNA’nın uçlarına Nsp1 adaptör dizisinin takılması için ligasyon reaksiyonu kurulmuştur. Adaptör diziye komplementer olan primerler kullanılarak belirli uzunluktaki DNA parçaları PZR ile amplifiye edilmiştir. 5 μl nükleaz-free su ve 2 μl yükleme boyası ile karıştırılan 3 μl PZR ürünü %2’lik agaroz jele yüklenerek, 5V/cm voltajda 45 dakika yürütülmüştür. Jelde smear halinde görülen örneğin, 150-2000 bp aralığında yoğun olarak kümelenmesi gerekmektedir. Bu aşamadaki 19 örneğin jel görüntüsü Şekil 4.1’de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Adaptör takılan fragmanların PZR amplifikasyonu sonucu agaroz jel görüntülemesi

Fragmente Edilen Örneklerin Jel Kontrolü

PZR amplifikasyonunu takiben agaroz jelde kontrolü yapılan örneklerin bead aracılığıyla pürifikasyonları yapılmış, daha sonra örneklerin nanodrop cihazı kullanılarak miktar ve saflık tayinleri gerçekleştirilmiştir. 19 örneğin konsantrasyonu 2.54-6.70 ug/ul aralığında saptanmıştır. OD260/OD280 değerleri 1.95-2.0 aralığında hesaplanarak yeterince saf bulunmuştur. Daha sonra her bir örneğin 45 µl'si, hazırlanan 10 µl fragmentasyon karışımı ile uygun koşullarda muamele edilmiştir. Fragmente edilen örnekler %4'lük agaroz jelde 5V/cm voltajda 45 dakika yürütülerek görüntülenmiştir. Örneklerin jel görüntüsü Şekil 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.2. Fragmente edilen PZR ürünlerinin agaroz jel görüntülemesi

Jelde örnekler kontrol edildikten sonra TdT enzimi ve işaretleme solüsyonu aracılığıyla işaretleme aşamasına geçilmiştir. İşaretlenen örnekler hibridizasyon solüsyonları ile muamele edilerek, 200 µl'si array çiplere yüklenmiştir. Çipler bir gece (16 saat) hibridizasyona bırakılmış, sonrasında çiplerin yıkanması, boyanması ve taranması aşamaları gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için elde edilen CYCHP dosyaları, Affymetrix ChAS 1.2.2 programı kullanılarak analiz edilmiştir.

CNV Analizi Bulguları

CYCHP dosyalarının her biri Affymetrix ChAS 1.2.2 programı içerisinde açılarak CNV analizi gerçekleştirilmiştir. Yanlış pozitif sonuçları engellemek için en az 50 prob ve 100 bç büyüklüğünde DNA'yı kapsayan amplifikasyonlar DNA kopya artışı olarak, en az 25 prob ve 100 bç'lik DNA'yı kapsayan delesyonlar ise DNA kopya kaybı olarak kabul edilmiştir. Buna bağlı olarak, 19 hastada toplam 42 mikrodelsyon, 73 mikroduplikasyon olmak üzere toplam 115 CNV saptanmıştır. Saptanan CNV'ler DGV veritabanı ve Harvard Üniversitesi Children's Hospital Tıbbi Laboratuvar bölümü verileri ile karşılaştırılmıştır. CNV'lerin DGV veritabanında rapor edilme sıklıkları belirlenmiştir. Rutin analiz için Harvard Üniversitesi Children's Hospital Tıbbi Laboratuvar bölümüne başvuran kaç bireyde olgularımızda saptanan CNV'lerin saptandığı belirlenmiştir. Çalışmamız kapsamında 19 olguda belirlenen CNV'lerin

lokalisasyonları, büyüklükleri, Hg19 versiyonuna göre kromozomal DNA içerisindeki sınırlarını gösteren minimum-maksimum nükleotid numaraları, Harvard Üniversitesi'nde saptanma/tekrar sayısı, DGV veritabanı verileri ve içerdikleri gen sayısı Tablo 4.2 – Tablo 4.20’de listelenmiştir.

Tablo 4.2. MA-09 nolu olguda saptanan CNV’ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	6	p25.3	127	254,253	381,137	3	Sık rastlanan	1
Delesyon	14	q11.2	222	22,746,791	22,968,854	21	Sık rastlanan	0
Duplikasyon	4	q31.21	340	144,740,569	145,080,267	>40	Sık rastlanan	3
Duplikasyon	8	q13.2	109	69,705,240	69,814,578	1	Sık rastlanan	1
Duplikasyon	14	q32.33	530	106,246,785	106,777,210	39	Sık rastlanan	3
Duplikasyon	16	p11.2	285	34,471,297	34,755,816	8	Sık rastlanan	3
Duplikasyon	17	q21.31	597	44,187,491	44,784,639	7	Sık rastlanan	8
Duplikasyon	22	q11.22	137	23,121,367	23,258,369	30	Sık rastlanan	2

Tablo 4.3. MA-22 nolu olguda saptanan CNV’ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	11	q11	223	54,701,631	54,924,587	10	Sık rastlanan	0
Delesyon	16	p11.2	746	29,432,212	30,177,916	8	Nadir	40
Delesyon	X	q25	768	126,937,856	127,706,114	0	Nadir	1
Duplikasyon	12	p13.31	120	8,004,411	8,124,048	3	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	14	q32.33	545	106,205,949	106,750,867	39	Sık rastlanan	3
Duplikasyon	17	q21.31	101	44,187,491	44,288,442	7	Sık rastlanan	2

Tablo 4.4. MA-23 nolu olguda saptanan CNV’ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	16	p13.3	243	6,774,500	7,017,793	0	Nadir	1
Delesyon	X	q21.32	272	92,229,963	92,501,843	0	Sık rastlanan	0
Duplikasyon	8	p11.22	137	39,247,097	39,384,337	8	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	14	q32.33	303	106,227,153	106,530,460	39	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	16	p11.2	936	32,848,682	33,784,810	8	Sık rastlanan	6
Duplikasyon	17	q21.31	101	44,187,491	44,288,442	7	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	22	q11.22	137	23,121,367	23,258,369	30	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	X	q26.3	108	134,746,947	134,854,875	1	Sık rastlanan	1

Tablo 4.5. MA-24 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	2	q13	862	110,504,318	111,365,996	0	Sık rastlanan	16
Delesyon	8	p11.22	140	39,247,097	39,386,952	26	Sık rastlanan	2
Delesyon	12	p13.31	120	8,004,411	8,124,048	1	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	6	q27	260	168,333,307	168,593,036	>40	Sık rastlanan	4
Duplikasyon	10	q11.22	1332	46,966,533	48,298,893	6	Sık rastlanan	18
Duplikasyon	14	q32.33	313	106,223,586	106,536,858	39	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	14	q32.33	224	106,667,114	106,890,855	39	Sık rastlanan	1
Duplikasyon	17	q21.31	597	44,187,491	44,784,639	7	Sık rastlanan	8

Tablo 4.6. MA-25 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	11	p11.12	3343	51,581,310	54,924,587	2	Sık rastlanan	0
Delesyon	16	p11.2	395	32,511,178	32,906,257	8	Sık rastlanan	4
Delesyon	20	p11.1	3191	26,305,565	29,497,009	1	Sık rastlanan	0
Duplikasyon	14	q32.33	267	106,263,718	106,530,460	39	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	14	q32.33	264	106,667,114	106,931,309	39	Sık rastlanan	1
Duplikasyon	17	q21.31	572	44,212,823	44,784,639	7	Sık rastlanan	8
Duplikasyon	22	q11.22	193	23,065,697	23,258,369	30	Sık rastlanan	2

Tablo 4.7. MA-26 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	X	p11.1	3439	58,507,403	61,946,674	1	Sık rastlanan	0
Duplikasyon	4	q13.2	175	69,367,092	69,541,894	2	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	8	p11.22	137	39,247,097	39,384,337	8	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	10	q26.3	173	135,204,187	135,377,265	3	Sık rastlanan	0
Duplikasyon	14	q32.33	742	106,206,397	106,948,691	39	Sık rastlanan	16

Tablo 4.8. MA-27 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	1	q44	107	248,688,586	248,795,277	1	Sık rastlanan	4
Delesyon	8	p11.22	140	39,247,097	39,386,952	26	Sık rastlanan	2
Delesyon	14	q11.2	111	22,829,383	22,940,284	21	Sık rastlanan	0
Duplikasyon	10	q11.22	1096	47,078,812	48,174,779	6	Sık rastlanan	16
Duplikasyon	14	q32.33	498	106,263,670	106,761,968	39	Sık rastlanan	3
Duplikasyon	22	q11.22	134	23,124,497	23,258,369	30	Sık rastlanan	2

Tablo 4.9. MA-29 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	10	p12.1	122	27,587,517	27,709,398	2	Sık rastlanan	0
Duplikasyon	6	p22.2	104	26,184,364	26,288,437	1	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	8	p11.22	130	39,254,032	39,384,337	8	Sık rastlanan	1
Duplikasyon	13	q14.11	116	41,178,626	41,294,741	1	Nadir	1
Duplikasyon	14	q32.33	278	106,258,855	106,536,858	39	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	18	p11.21	3472	15,136,152	18,608,374	0	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	22	q11.22	112	23,146,338	23,258,369	30	Sık rastlanan	2

Tablo 4.10. MA-30 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	12	p13.31	120	8,004,411	8,124,048	1	Sık rastlanan	2
Delesyon	14	q11.2	415	22,558,877	22,974,280	21	Sık rastlanan	0
Delesyon	19	p12	122	20,598,429	20,720,705	4	Sık rastlanan	1
Duplikasyon	6	p21.33	174	31,852,726	32,026,756	1	Sık rastlanan	16
Duplikasyon	14	q32.33	330	106,206,397	106,536,858	39	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	14	q32.33	282	106,667,114	106,948,691	39	Sık rastlanan	2

Tablo 4.11. MA-31 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	8	p11.22	140	39,247,097	39,386,952	26	Sık rastlanan	2
Delesyon	14	q11.2	197	22,747,482	22,944,507	21	Sık rastlanan	0
Delesyon	14	q32.33	179	105,280,461	105,459,354	3	Sık rastlanan	5
Delesyon	15	q11.2	388	23,290,798	23,679,133	4	Sık rastlanan	4
Duplikasyon	1	p21.3	323	95,000,754	95,323,325	1	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	14	q32.33	800	106,227,153	107,027,236	39	Sık rastlanan	4
Duplikasyon	16	p11.2	1242	32,554,241	33,796,740	8	Sık rastlanan	6
Duplikasyon	17	q21.31	101	44,187,491	44,288,442	7	Sık rastlanan	2

Tablo 4.12. MA-34 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	8	p11.22	140	39,247,097	39,386,952	26	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	1	q21.1	110	145,146,853	145,256,873	8	Sık rastlanan	1
Duplikasyon	4	q13.2	175	69,367,092	69,541,894	2	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	6	p22.2	121	26,167,318	26,288,437	1	Sık rastlanan	18
Duplikasyon	12	p13.31	131	8,004,411	8,135,534	3	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	14	q32.33	620	106,329,183	106,948,691	39	Sık rastlanan	4
Duplikasyon	16	p11.2	294	34,471,297	34,765,444	8	Sık rastlanan	3

Tablo 4.13. MA-37 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	4	q13.2	122	69,435,966	69,558,258	2	Sık rastlanan	1
Delesyon	8	p11.22	140	39,247,097	39,386,952	26	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	10	q11.22	1237	46,966,533	48,203,688	6	Sık rastlanan	18
Duplikasyon	14	q32.33	480	106,270,855	106,751,271	39	Sık rastlanan	3
Duplikasyon	17	q24.1	171	62,802,573	62,973,942	0	Sık rastlanan	5

Tablo 4.14. MA-45 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Duplikasyon	10	q11.22	947	47,059,807	48,006,310	6	Sık rastlanan	15
Duplikasyon	14	q32.33	324	106,206,397	106,530,460	39	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	17	q21.31	101	44,187,491	44,288,442	7	Sık rastlanan	2

Tablo 4.15. MA-53 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	8	p11.22	140	39,247,097	39,386,952	26	Sık rastlanan	2

Tablo 4.16. MA-56 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	8	p11.22	140	39,247,097	39,386,952	26	Sık rastlanan	2
Delesyon	8	q24.23	180	137,682,509	137,862,435	8	Sık rastlanan	0
Delesyon	14	q32.33	247	106,530,533	106,777,331	3	Sık rastlanan	1
Duplikasyon	1	p31.1	263	76,357,590	76,620,268	1	Nadir	3
Duplikasyon	10	q26.3	120	135,252,178	135,372,601	3	Sık rastlanan	3
Duplikasyon	14	q32.33	260	106,270,453	106,530,460	39	Sık rastlanan	2

Tablo 4.17. MA-58 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	14	q11.2	197	22,747,482	22,944,507	21	Sık rastlanan	0
Delesyon	19	p12	122	20,598,429	20,720,705	4	Sık rastlanan	1
Delesyon	X	p11.1	3439	58,507,403	61,946,674	1	Sık rastlanan	0
Duplikasyon	10	q11.22	947	47,059,807	48,006,310	6	Sık rastlanan	15
Duplikasyon	12	p13.31	131	8,004,411	8,135,534	3	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	14	q32.33	800	106,227,153	107,027,236	39	Sık rastlanan	4
Duplikasyon	17	q21.31	101	44,187,491	44,288,442	7	Sık rastlanan	2

Tablo 4.18. MA-61 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	10	p12.1	122	27,587,517	27,709,398	2	Sık rastlanan	0
Delesyon	14	q32.33	247	106,530,533	106,777,331	3	Sık rastlanan	1
Duplikasyon	16	p11.2	294	34,471,297	34,765,444	8	Sık rastlanan	3
Duplikasyon	17	q21.31	101	44,187,489	44,288,442	7	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	18	p11.21	3472	15,136,152	18,608,380	0	Sık rastlanan	2
Duplikasyon	X	q26.3	108	134,746,947	134,854,875	1	Sık rastlanan	1

Tablo 4.19. MA-62 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	14	q32.33	179	105,280,461	105,459,354	3	Sık rastlanan	5
Duplikasyon	6	q27	260	168,333,307	168,593,036	>40	Sık rastlanan	4
Duplikasyon	10	q11.22	1332	46,966,533	48,298,893	6	Sık rastlanan	18
Duplikasyon	14	q32.33	224	106,667,114	106,890,855	39	Sık rastlanan	1
Duplikasyon	17	q21.31	597	44,187,491	44,784,639	7	Sık rastlanan	8

Tablo 4.20. MA-66 nolu olguda saptanan CNV'ler

CNV Tipi	Kromozom	Bant	Kb	Minimum (Hg19)	Maksimum (Hg19)	Tekrar Sayısı (Harvard Verileri)	DGV Veritabanı	Gen Sayısı
Delesyon	8	p11.22	140	39,247,097	39,386,952	26	Sık rastlanan	2
Delesyon	14	q11.2	197	22,747,469	22,944,507	21	Sık rastlanan	0
Delesyon	19	p12	122	20,598,429	20,720,705	4	Sık rastlanan	1
Delesyon	X	p11.1	3439	58,507,403	61,946,674	1	Sık rastlanan	0
Duplikasyon	16	p11.2	1242	32,554,241	33,796,740	8	Sık rastlanan	6
Duplikasyon	17	q21.31	101	44,187,491	44,288,450	7	Sık rastlanan	2

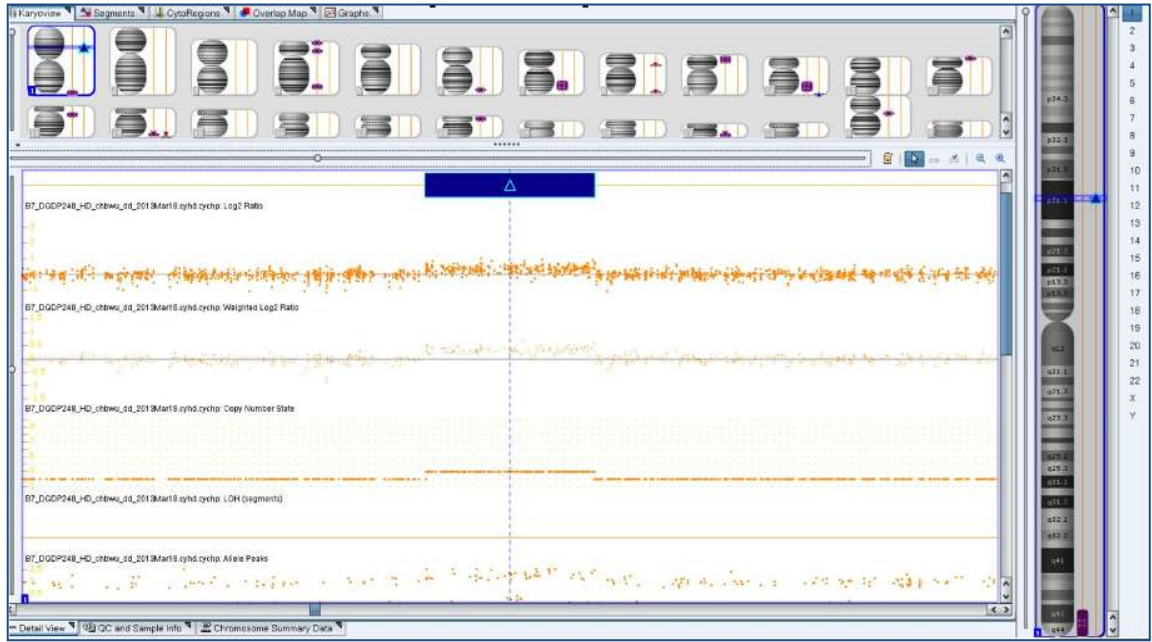
Belirlenen CNV'ler, DGV veritabanı ve Harvard Üniversitesi Children's Hospital verileri ile karşılaştırılıp benign olanlar dışlanmış, yüksek olasılıklı patolojik olanlar belirlenmiştir. CNV bölgesindeki gen yoğunluğu da, patojeniteyi belirleme açısından bir parametre olarak alınmıştır. Gen yoğunluğu açısından fakir bölgelerin benign olma olasılıkları artmaktadır. Benign CNV'lerin dışlanması ile, dört hastada (MA-22, MA-23, MA-29, MA-56) beş farklı yüksek olasılıklı patolojik CNV saptanmıştır. Bu CNV'ler, MA-56 nolu olguda 1p31.1 duplikasyonu (Şekil 4.3), MA-29 nolu olguda 13q14.11 duplikasyonu (Şekil 4.4), MA-22 nolu olguda 16p11.2 delesyonu (Şekil 4.5), MA-23

nolu olguda 16p13.3 delesyonu (Şekil 4.6), MA-22 nolu olguda saptanan Xq25 delesyonudur (Şekil 4.7). Patolojik CNV saptanan olguların klinik özelliklerine bakıldığı zaman, tamamı Tip 1 Mülleryan aplazi tanılıdır. Ayrıca, 16p11.2 ve Xq25 delesyonlarının saptandığı MA-22 nolu olgunun ultrasonografik görüntülemesinde over net gözlenmemiş, 13q14.11 duplikasyonunun saptandığı MA-29 nolu olgunun ise sol overi hipoplastik olarak kaydedilmiştir (bkz. Tablo 4.1). Yüksek olasılıklı patolojik CNV'lerin lokalizasyonları, Kb cinsinden büyüklükleri, kromozomal DNA içerisindeki sınırlarını gösteren minimum-maksimum nükleotid numaraları, içerdikleri gen sayısı ve genler Tablo 4.21'de gösterilmiştir.

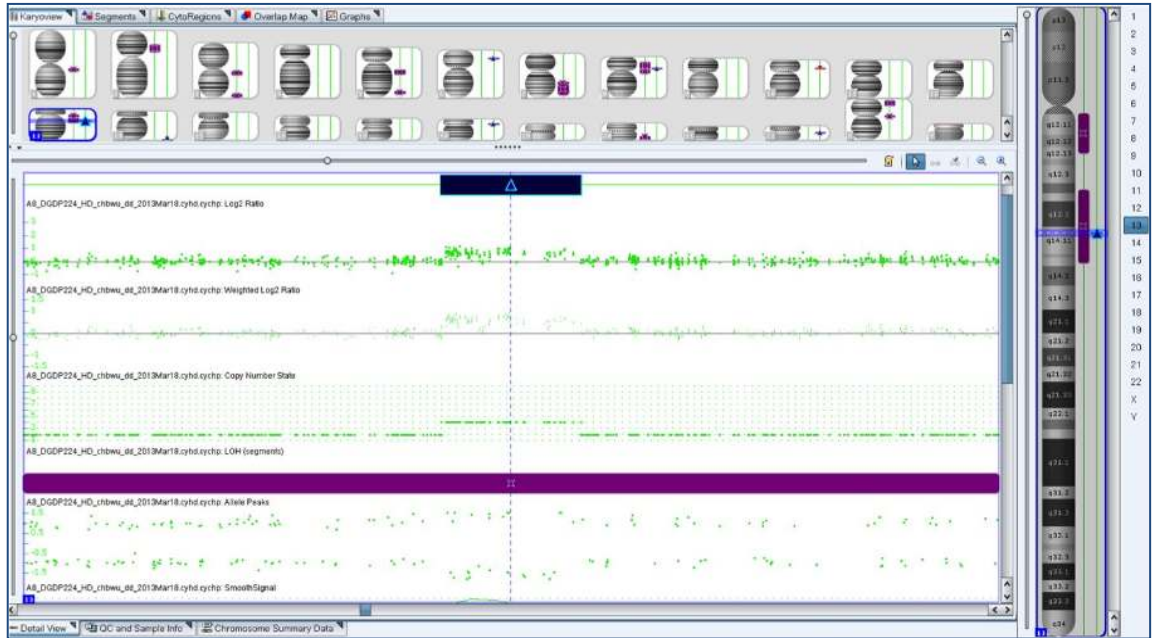
Tablo 4.21. Mülleryan aplazili dört olguda saptanan yüksek olasılıklı patolojik CNVler

Olgu No	CNV	Kb	Lokalizasyon (Min-Maks/Hg19)	Gen Sayısı	Genler
MA-56	1p31.1dup	263	76,357,590-76,620,268	3	<i>MSH4, ASB17, ST6GALNAC3</i>
MA-29	13q14.11dup	116	41,178,626-41,294,741	1	<i>FOXO1</i>
MA-22	16p11.2del	746	29,432,212-30,177,916	44	<i>AK096982, LOC440354, SLX1BB, SULT1A4, BOLA2, SLX1A, SULT1A3, LOC23117, DQ576952, DQ595631, LOC613038, LOC100132247, NPIPL3, SLC7A5P1, SPN, QPRT, C16orf54, BC041466, ZG16, MAZ, KIF22, PRRT2, PAGR1, BC029255, MVP, CDIPT, SEZ6L2, ASPHD1, KCTD13, TMEM219, TAOX2, HIRIP3, INO80E, DOC2A, FAM57B, AK097527, C16orf92, ALDOA, PPP4C, TBX6, YPEL3, AK097453, GDPD3, MAPK3</i>
MA-23	16p13.3del	243	6,774,500-7,017,793	1	<i>RBFOX</i>
MA-22	Xq25del	768	126,937,856-127,706,114	1	<i>ACTRT1</i>

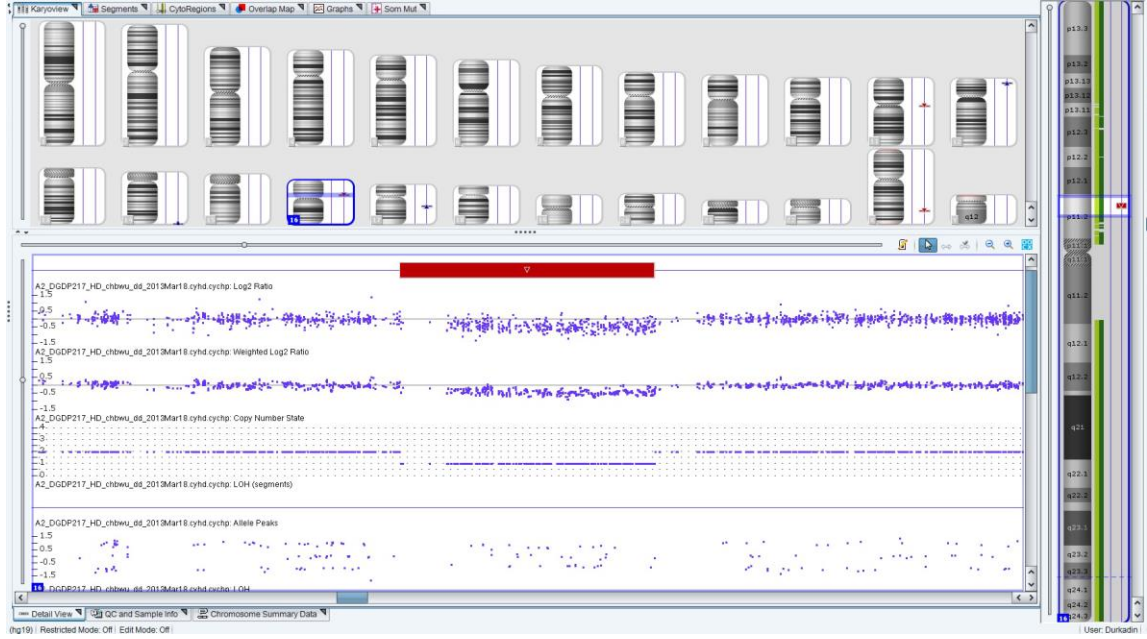
Saptanan CNV'lerin ChAS 1.2.2 programı aracılığıyla elde edilen analiz görüntüleri Şekil 4.3-4.7'de verilmiştir. Log2 ratio değeri yaklaşık -0.5 olan 16p11.2del (Şekil 4.5), 16p13.3del (Şekil 4.6), Xq25del (Şekil 4.7) ve +0.5 olan 1p31.1dup (Şekil 4.3), varyasyonları heterozigot olarak belirlenmiştir. Yalnızca, tespit edildiği olguda 13 nolu kromozomun q13.1 bölgesinde 13.375 Kb'lik homozigot bir genomik bölgenin içinde yer alan 13q14.11dup varyasyonu (Şekil 4.4) homozigot olarak belirlenmiş, log2 ratio değeri yaklaşık olarak +1 olarak bulunmuştur. Her bir varyasyonun log2 ratio değeri ve buna bağlı olarak segmental kopya sayısı, ilgili şekiller üzerinde görülmektedir.



Şekil 4.3. MA-56 numaralı olguda saptanan heterozigot 1p31.1 duplikasyonu



Şekil 4.4. MA-29 numaralı olguda saptanan homozigot 13q14.11 duplikasyonu



Şekil 4.5. MA-22 numaralı olguda saptanan heterozigot 16p11.2 delesyonu



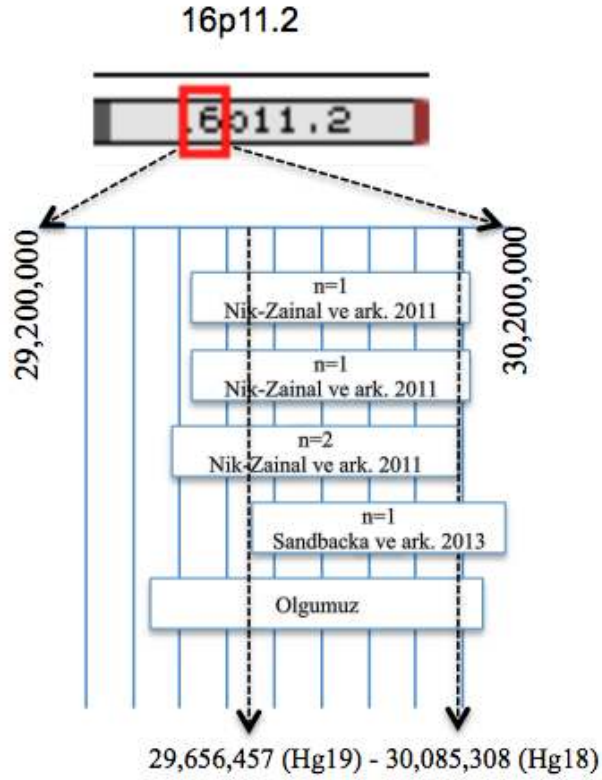
Şekil 4.6. MA-23 numaralı olguda saptanan heterozigot 16p13.3 delesyonu



Şekil 4.7. MA-22 numaralı olguda saptanan heterozigot Xq25 delesyonu

CNV Bulgularının Literatür ile Karşılaştırılması

Olgularımızda saptanan yüksek olasılıklı patolojik CNV'ler literatür ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma ile aynı kromozomal bölgede saptanan her bir CNV'nin kapsadığı ortak DNA dizisi belirlenmiştir. Literatüre bakıldığı zaman, Mülleryan aplazili olgularda en sık saptanan CNV'lerden biri 16p11.2'deki varyasyonlardır. 2011 yılında Nik-Zainal ve arkadaşlarının belirlediği dört, 2013 yılında Sandbacka ve arkadaşlarının saptadığı bir olgu ve bizim olgumuzla beraber, günümüze kadar altı olguda bu bölgede varyasyon saptanmıştır (44, 47). Bu altı olguda saptanan ortak varyant genomik bölge Şekil 4.8'de gösterildiği gibi yaklaşık 429 Kb büyüklüğündedir. Bu nihai bölgede; Sialoforin (*SPN*), Kuinolinat Fosforibozil Transferaz (*QPRT*), Kromozom 16 Open Reading Frame 54 (*C16orf54*), Zimojen Granül Protein 16 (*ZG16*), Myc İlişkili Çinko Parmak Protein (74), Kinezin Ailesi Üyesi 22 (*KIF22*), Prolin Zengin Transmembran Protein 2 (*PRRT2*), PAXIP1 İlişkili Glutamat Zengin Protein 1 (*PAGR1*), Major Vault Protein (*MVP*), CDP-Diaçilgliserol-Inositol3-Fofotidil Transferaz (*CDIPT*), Seizure (felç, atak) İlişkili Mouse Homolog 6 benzeri 2 (*SEZ6L2*), Aspartat Beta Hidroksilaz Domaini İçeren 1 (*ASPHD1*), Potasyum Kanal Tetramerizasyon Domaini İçeren 13 (*KCTD13*), Transmembran Protein 219 (*TMEM219*), TAO Kinaz 2 (*TAOK2*), HIRA Interacting Protein 3 (*HIRIP3*), INO80 Kompleks Subünite E (*INO80E*), Double C2 Benzeri Domain (*DOC2A*), Family with Sequence Similarity 57, Member B (*FAM57B*), Kromozom 16 Open Reading Frame 92 (*C16orf92*), Aldolaz A-Fruktoz Bifosfat (*ALDOA*), Protein Fosfat 4 Katalitik Subünite (*PPP4C*), T-Box 6 (*TBX6*), Yippee-like 3 (*YPEL3*), Gliserofosfodiester Fosfodiesteraz Domain İçeren 3 (*GDPD3*), Mitojen-activated Protein Kinaz 3 (*MAPK3*) genleri olmak üzere, toplam 26 gen lokalizedir.



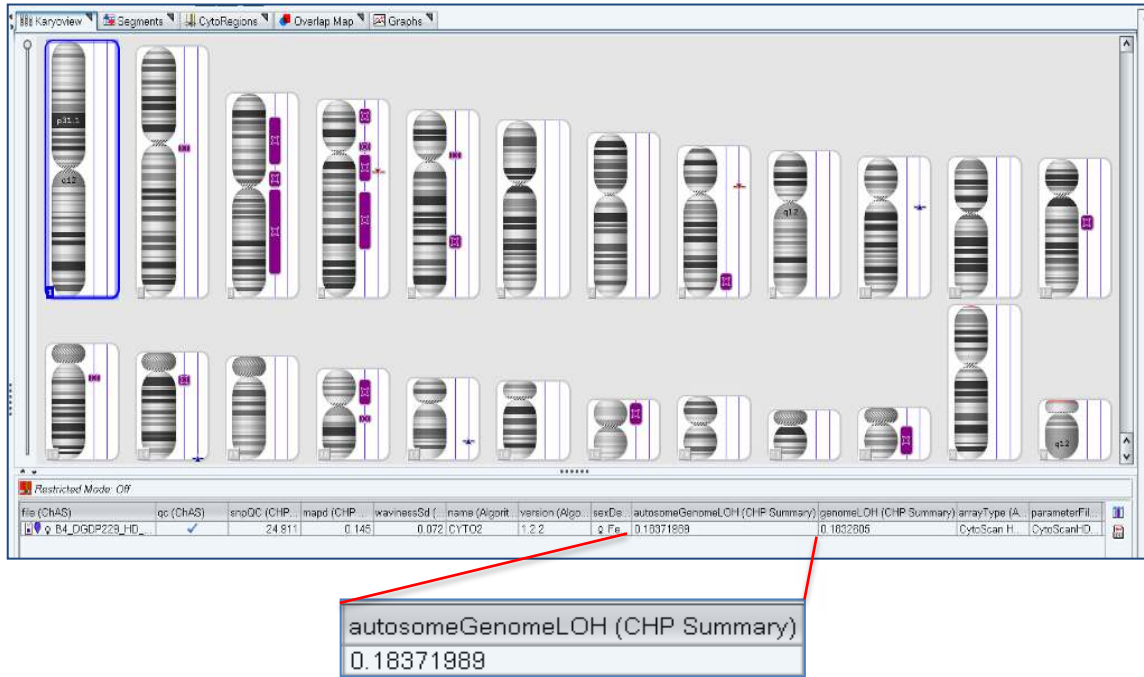
n: olgu sayısı

Şekil 4.8. Literatürde Mülleryan aplazili olgularda tanımlanmış 16p11.2 mikrolelesyonu bölgeleri

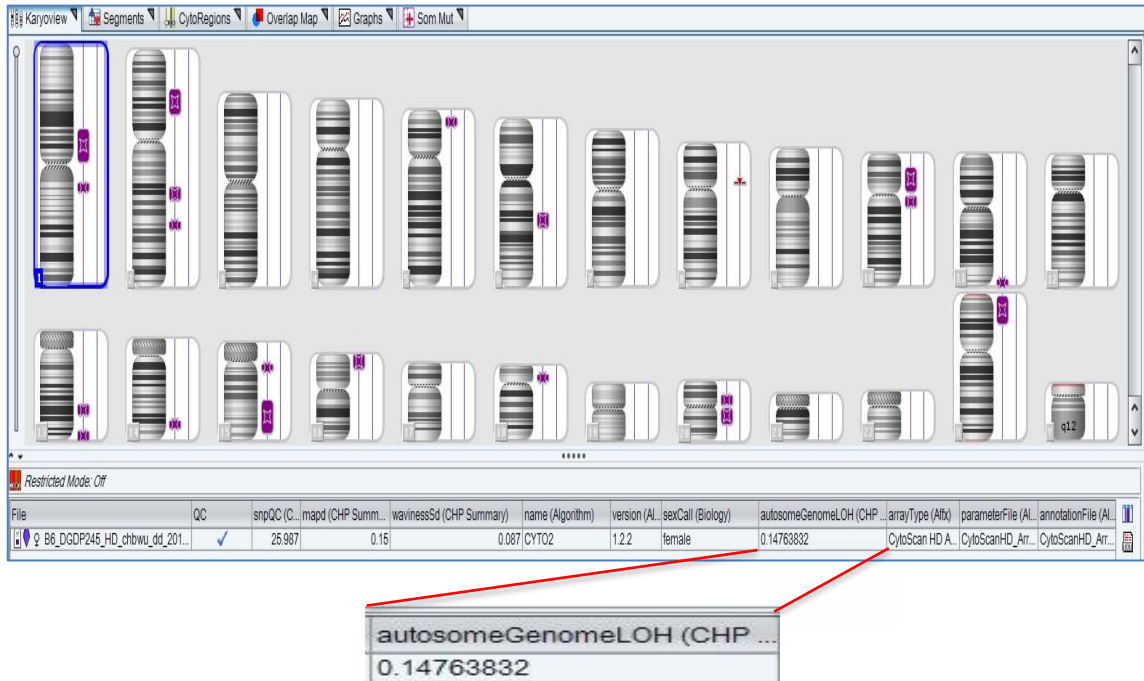
4.4. LOH/Homozigosite Bulguları

Olguların anamnez verilerine göre parental akraba evliliği olan sekiz, ailesinde Mülleryan aplaziden etkilenmiş başka birey olan bir ve diğer 10 olgunun LOH analizleri yapılmıştır. Affymetrix CytoScan HD platformunun sahip olduğu 750.000 SNP probu aracılığıyla, 19 olgunun homozigot genomik bölgeleri tespit edilmiştir. Affymetrix ChAS 1.2.2 programı ile data analizi sonucu, homozigot bölgeler kromozomun yanında mor renk olarak gösterilmektedir. Örnek olarak, homozigosite oranı yüksek bulunan olgulardan olan MA-37, MA-53'ye ait analiz görüntüleri, sırasıyla Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 olarak sunulmuştur. LOH analizi sonucu, bütün olguların homozigosite gösteren kromozomal bölgeleri listelenmiş, olgular arasında paylaşılan, ortak bölgeler açısından birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Ancak, Mülleryan aplazi ile ilişkisi olabilecek resesif kalıtılan genleri içermesi olası olan ortak bir bölgeye rastlanmamıştır.

Akrabalık derecesi tayininde kullanılan F_{ROH} değeri de, program tarafından otomatik olarak hesaplanmakta, Şekil 4.9 ve 4.10'da gösterildiği gibi program içerisinde görülmektedir. Şekillerde görülen AutosomeGenomeLOH verileri 0.1837 ve 0.1476 olan olguların F_{ROH} değerleri sırasıyla %18.3 ve %14.7'dir.



Şekil 4.9. MA-37 nolu olguya ait homozigosite verileri



Şekil 4.10. MA-53 nolu olguya ait homozigosite verileri

LOH analizi verileri ile, olguların anamnezine göre, birinci derece kuzen evliliği (biyolojik olarak ikinci derece akrabalık) yaptığı bilinen sekiz olgunun yedi tanesinin ebeveynlerinin akrabalık derecesi ikinci derece bulunarak anamnez doğrulanmıştır. Yine anamnezine göre, ebeveynleri birinci derece kuzen evliliği yaptığı bilinen MA-62 nolu olgunun anne-babası, daha yakın akrabalık derecesi olan birinci derece olarak bulunmuştur. Ebeveynlerinin akrabalık dereceleri bilinmeyen diğer olguların F_{ROH} verilerine göre parental akrabalık dereceleri, Tablo 4.22’de sunulmuştur.

Tablo 4.22. Olguların % Otozomal LOH verileri (F_{ROH}) ve buna bağlı akrabalık dereceleri

Olgu No	LOH Analizinden Önce	LOH Analizinden sonra	
	Parental Akrabalık (olgunun anamnezine göre)	% Otozomal LOH	Parental Akrabalık Derecesi
MA-09	Birinci kuzen	%11,4	İkinci derece
MA-22	n/a	%3,7	Dördüncü derece
MA-23	n/a	%2,9	Dördüncü derece
MA-24	n/a	%4,0	Dördüncü derece
MA-25	n/a	%6,86	Üçüncü derece
MA-26	n/a	%5,8	Üçüncü derece
MA-27	n/a	%9,9	İkinci derece
MA-29	Birinci kuzen	%10,3	İkinci derece
MA-30	n/a	%4,4	Üçüncü ya da dördüncü derece
MA-31	n/a	%3,7	Dördüncü derece
MA-34	Akrabalık yok	%13,1	İkinci derece
MA-37	Birinci kuzen	%18,3	İkinci derece
MA-45	Birinci kuzen	%8,8	İkinci derece
MA-53	Birinci kuzen	%14,7	İkinci derece
MA-56	Birinci kuzen	%10,7	İkinci derece
MA-58	Birinci kuzen	%20	Birinci ya da ikinci derece
MA-61	Akrabalık yok	%6,4	Üçüncü derece
MA-62	Birinci kuzen	%23,5	Birinci derece
MA-66	n/a	%20,9	İkinci derece

n/a: bilgi yok

4.5. Dizi Analizi ile Olası Aday Genlerde Belirlenen Varyasyonlar

Projemizi ortaklaşa yürüttüğümüz Amerika Birleşik Devletleri, Georgia Tıp Fakültesi’nden Dr. Layman ve ekibi tarafından belirlenen 12 adet olası aday genin (*WNT4*, *CNOT10*, *TRIM71*, *ZNF200*, *ZNF213*, *OR1F1*, *KIAA1680/FAM190A*, *CHSY3*,

LRRTM3, *CTNNA3*, *HNFB1B*, *LHX1*) Sanger dizileme tekniği ile tüm ekzon ve ekzon dizilerine yakın intronik bölgelerin dizi analizi yapılmıştır (Tablo 4.5). Olası aday genler; literatür verileri, Prof. Dr. Lawrence C. Layman ve ekibi tarafından bir Amerikalı olguda belirlenen t(3;16) kromozomal abnormalitesinin kırık noktalarında lokalize genler ve Amerikalı olgularda saptanan CNV bölgelerinden (4q22.1dup, 5q23.3dup, 10q21.3del, 16p13.3, 17q12del) yola çıkılarak belirlenmiştir.

Tamamı, Mülleryan aplazili Türk olgular olmak üzere 19 olgunun *WNT4* geni, 16 olgunun *CNOT10*, *ZNF200*, *ZNF213*, *ORIF1* genleri, 19 olgunun *TRIM71*, *CTNNA3*, *LRRTM3*, KIAA1680 (*FAM190A*), *CHSY3* genleri, 66 olgunun *HNFB1B* ve *LHX1* genleri analiz edilmiştir. İlgili genlere ait bilgiler Tablo 4.23’de sunulmuştur.

Tablo 4.23. Dizi analizi yapılan olası aday genler

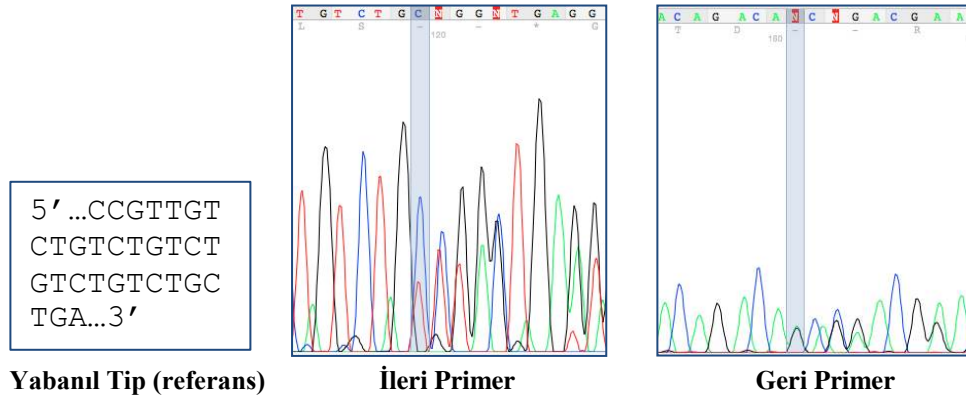
Gen	Kromozomal Lokalizasyon	NM#	mRNA Uzunluğu	Ekzon Sayısı	Dizi Analizi Yapılan Olgu Sayısı
<i>WNT4</i>	1p36.23	NM_030761.4	6,876 Kb	8	19
<i>CNOT10</i>	3p22.3	NM_015442	2,829 Kb	23	16
<i>TRIM71</i>	3p22.3	NM_001039111.1	3,138 Kb	4	19
<i>ZNF200</i>	16p13.3	NM_003454.3	3,387 Kb	7	16
<i>ZNF213</i>	16p13.3	NM_004220.2	3.301 Kb	6	16
<i>ORIF1</i>	16p13.3	NM_012360.1	939 bç	4	16
<i>FAM190A</i>	4q22.1	NM_001145065.1	3,971 Kb	33	19
<i>CHSY3</i>	5q23.3	NM_175856.4	3,523 Kb	8	19
<i>LRRTM3</i>	10q21.3	NM_178011.4	6.051 Kb	5	19
<i>CTNNA3</i>	10q21.3	NM_013266	10,710 Kb	23	19
<i>HNFB1B</i>	17q12	NM_000458.3	2,815 Kb	11	66
<i>LHX1</i>	17q12	NM_005568.4	3,428 Kb	5	66

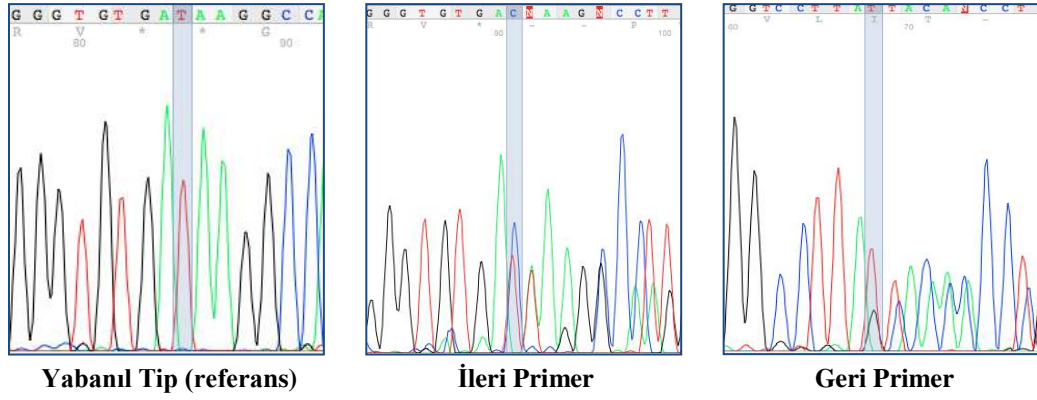
Ekzonik ve ekzonlara yakın intronik bölgelerin dizi analizi sonuçlarına göre, olguların hiçbirinde *WNT4*, *CNOT10*, *TRIM71*, *ZNF200*, *ZNF213*, *CHSY3*, *LRRTM3* ve *ORIF1* genlerinde genetik değişim saptanmamıştır. Ancak, *FAM190A* geninde, bir olguda (MA-33) c.2117A>G (p.Lys706Arg) varyasyonu saptanmıştır. Aynı olgunun *CTNNA3* geninde ise c.1732+13C>T olmak üzere bir intronik SNP belirlenmiştir. *HNFB1B* geninde ise; MA-21, MA-25, MA-27, MA-51, MA-52, MA-59 nolu olgularda c.545-49_50insTGTC ve MA-24, MA-29, MA-42, MA-59, MA-63 nolu olgularda ise c.1535+47_48insC olmak üzere intronik insersiyonlar saptanmıştır. MA-32, MA-33, MA-49, MA-50, MA-58 olmak üzere beş olgunun *LHX1* geninde c.1162G>T (p.Ala388Ser) varyasyonu tespit edilmiştir. Saptanan varyasyonlar, Tablo 4.24’de sunulmuştur.

Tablo 4.24. Dizi analizi bulguları

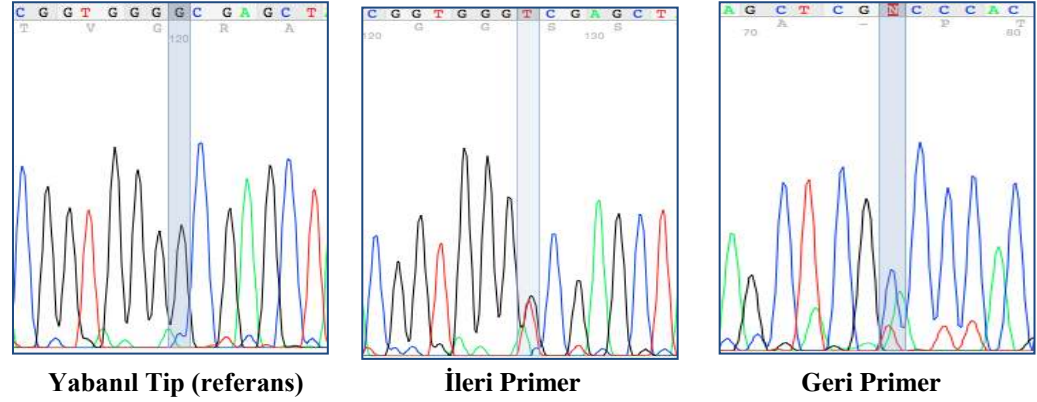
Gen	Ekzon / İntron	Nükleotid Değişimi	Aa Değişimi	Olgu No	Şekil No
<i>HNF1B</i>	İntron 2	c.545-49_50insTGTC	-	MA-21, MA-25, MA-27, MA-51, MA-52, MA-59	Şekil 4.11
	İntron 8	c.1535+47_48insC	-	MA-24, MA-29, MA-42, MA-59, MA-63	Şekil 4.12
<i>LHX1</i>	Ekzon 5	c.1162G>T	p.Ala388Ser	MA-32, MA-33, MA-49, MA-50, MA-58	Şekil 4.13
<i>FAM190A</i>	Ekzon 9	c.2117A>G	p.Lys706Arg	MA-33	-
<i>CTNNA3</i>	İntron 12	c.1732+13C>T	-	MA-33	-

MA-52'deki c.545-49_50insTGTC varyasyonu homozigot, diğer olgularda tespit edilen varyasyonlar heterozigot olarak belirlenmiştir. *LHX1* geninde saptanan c.1162G>T (p.Ala388Ser) (rs145694637) varyasyonu dışındaki tüm varyasyonlar, daha önce literatürde tanımlanmamış, çalışmamızca yeni olarak belirlenen genetik değişimlerdir. Dizi analizi ile belirlenen varyasyonları gösteren elektroforegramlar Şekil 4.11-4.13'de gösterilmiştir. *FAM190A* ve *CTNNA3* genlerinde belirlenen varyasyonların elektroforegramları gösterilmemiş olup doğrulanmaları gerekmektedir.

**Şekil 4.11.** *HNF1B* geninde saptanan c.545-49_50insTGTC varyasyonu elektroforegramları



Şekil 4.12. *HNF1B* geninde saptanan c.1535+47_48insC varyasyonu elektroforegramları



Şekil 4.13. *LHX1* geninde saptanan c.1162G>T (p.Ala388Ser) varyasyonu elektroforegramları

Aday genlerde varyasyon saptanan olgulardan unilateral renal agenezi bulunan MA-58 dışındaki olgular tip 1 Mülleryan aplazi tanılıdır. *LHX1* genlerinde yanlış anlamlı varyasyon (p.Ala388Ser) saptanan MA-32 nolu olguda hipoplastik over, MA-50’de bilateral pelvikaliksiyal dilatasyon, *HNF1B* genlerinde varyasyon saptanan MA-21 nolu olguda overlerde folikül yokluğu ve parsiyel empty sella, MA-29 nolu olguda ise hipoplastik over varlığı belirlenmiştir.

4.6. Saptanan Varyasyonların Aile Bireylerinde Taranması

Ulaşılabilen aile bireylerinin tükürük örneklerinden elde edilen DNA örnekleri ile olguların *HNF1B* ve *LHX1* genlerinde saptanan varyasyonlar açısından yapılan aile taramasında, tüm varyasyonların ailesel olarak kalıtıldığı tespit edilmiştir. Varyasyon spesifik dizi analizi yapılan aile bireylerine ait bulgular Tablo 4.25-4.27’de sunulmuştur. Olguların ailelerinde Mülleryan aplaziden etkilenmiş bilinen birey bulunmamaktadır. *FAM190A* ve *CTNNA3* genlerinde varyasyon saptanan MA-33 nolu olgunun anne, baba ve iki kız kardeşi ilgili varyasyonlar açısından incelenmiş, bu varyasyonları taşımadıkları belirlenmiştir.

Tablo 4.25. Hasta olguların *HNF1B* geninde saptanan c.545-49_50insTGTC varyasyonunun aile bireylerindeki durumu

Gen/Lokalizasyon	Olgu/Aile	c.545-49_50insTGTC
<i>HNF1B</i>_IVS2 17q12	MA-21	Heterozigot
	MA-25	Heterozigot
	MA-25'in annesi	Heterozigot
	MA-25'in babası	Heterozigot
	MA-25'in kız kardeşi	Heterozigot
	MA-27	Heterozigot
	MA-51	Heterozigot
	MA-51'in annesi	Homozigot
	MA-51'in babası	Heterozigot
	MA-52	Homozigot
	MA-52'nin annesi	Homozigot
	MA-52'nin kız kardeşi 1	Homozigot
	MA-52'nin kız kardeşi 2	Heterozigot
	MA-59	Heterozigot
	MA-59'un annesi	Homozigot
	MA-59'un babası	Heterozigot

Tablo 4.26. Hasta olguların *HNF1B* geninde saptanan c.1535+47_48insC varyasyonunun aile bireylerindeki durumu

Gen/Lokalizasyon	Olgu/Aile	c.1535+47_48insC
<i>HNF1B</i>_IVS8 17q12	MA-24	Heterozigot
	MA-24'ün annesi	Normal
	MA-24'ün kız kardeşi	Heterozigot
	MA-29	Heterozigot
	MA-29'un annesi	Normal
	MA-29'un babası	Heterozigot
	MA-42	Heterozigot
	MA-59	Heterozigot
	MA-59'un annesi	Normal
	MA-59'un babası	Heterozigot
	MA-63	Heterozigot

Tablo 4.27. Hasta olguların *LHX1* geninde saptanan c.1162G>T (p.Ala388Ser) varyasyonunun aile bireylerindeki durumu

Gen/Lokalizasyon	Olgu/Aile	c.1162G>T (p.Ala388Ser)
<i>LHX1</i>_Ekzon 5 17q12	MA-32	Heterozigot
	MA-33	Heterozigot
	MA-33'ün annesi	Normal
	MA-33'ün babası	Heterozigot
	MA-33'ün kız kardeşi 1	Heterozigot
	MA-33'ün kız kardeşi 2	Heterozigot
	MA-49	Heterozigot
	MA-49'un annesi	PZR çalışmadı
	MA-49'un kız kardeşi 1	Heterozigot
	MA-49'un kız kardeşi 2	Normal
	MA-49'un kız kardeşi 3	Normal
	MA-50	Heterozigot
	MA-50'nin annesi	Heterozigot
	MA-50'nin babası	Normal
	MA-50'nin kız kardeşi	Heterozigot
	MA-58	Heterozigot

4.7. İn-siliko Analiz Verileri

LHX1 geninde beş olguda saptanan c.1162G>T (p.Ala388Ser) varyasyonu SIFT analizi sonucunda tolere edilebilir bir varyasyon olarak tespit edilmiştir. Varyasyonun SIFT analizi verileri Şekil 4.14'de sunulmuştur. MA-33 nolu olguda saptanan *FAM190A* genindeki c.2117A>G (p.Lys706Arg) varyasyonunun SIFT analizi yapılamamıştır. Genomik çalışmaları devam eden *FAM190A* geninin referans dizisi tamamlanmamıştır.

RefSeq Protein ID	Known Protein ID	Substitution	Region	dbSNP ID	SNP Type	Prediction	Score	Median Info	# Seqs at position	Gene ID	Gene Name
NP_005559	P48742	A388S	EXON CDS	rs145694637:T	Nonsynonymous	<u>TOLERATED</u>	0.99	3.21	15	ENSG00000132130	LHX1

Şekil 4.14. *LHX1* geninde belirlenen c.1162G>T (p.Ala388Ser) varyasyonuna ait SIFT analizi verileri

TARTIŞMA

Hastalıkların gelişiminde etkin olan genlerin tespit edilmesi, işlevlerinin ortaya konulması ve bu hastalıklara yönelik tedavi stratejilerinin gerçekleştirilmesinde gen haritalaması önemli bir yere sahiptir. Günümüzde, insan genlerinin haritalanması, tıbbi genetik çalışmalarının en hızlı gelişen ve oldukça önem kazanmış alanlarından biridir. Genetik haritalama sıklıkla linkaj analizi ya da bağlantı analizleri yoluyla yapılmaktadır. Son yıllarda, teknolojinin hızlı ilerlemesiyle geliştirilen CGH-array, SNP-array gibi mikrodizin sistemleri de genetik haritalama çalışmalarındaki yerlerini almıştır. Bu sistemler sayesinde, hastalıkla ilişkili genlerin lokalizasyonu, tüm genomu yayılmış problemler ile belirlenebilmektedir. Prob sayısı hastalıkla ilişkili bölgenin daraltılması, verinin doğruluğu ve sistemin hassasiyeti açısından son derece önemlidir. Bu anlamda, yüksek kapasiteli sistemlerin kullanılması çok daha bilgi verici olmaktadır.

Çalışmamızın ilk basamağı olan klinik inceleme aşamasında, olguların detaylı klinik verileri derlenmiş, derleme aşamasında kullanılan “Hasta Klinik Değerlendirme Formu” EK-1’de sunulmuştur. Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında yapılan rutin biyokimyasal neticesinde, bazı olguların FSH, LH, TSH, E2, PRL, PRG hormon değerlerinde sapmalar belirlenmiştir. Erman-Akar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada tez projemiz kapsamındaki olguları da kapsayan, uterus transplantasyonu için başvuran 109 Mülleryan aplazili olgunun klinik bulguları değerlendirmiştir. Histerektomi yapılan olgularla karşılaştırılan Mülleryan aplazili olguların AMH seviyeleri ve over rezervleri daha iyi düzeyde bulunmuştur (75). Özekinci ve arkadaşlarının çalışmasına göre de Tip 2 Mülleryan aplazili olguların AMH seviyeleri ve over rezervleri, tip 1 Mülleryan aplazili olgulara göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak düşük bulunmuştur (76). Mülleryan aplazili olgularda FSH ve LH seviyelerinde sapmalar tespit edilebilmektedir. Ancak bunların Mülleryan bozukluklar ile ilişkisi henüz bilinmemektedir (17). Bu biyokimyasal sapmalar, olguların menstrual siklusuna bağlı olarak fizyolojik bir değişim olarak da gelişebilmektedir.

Çalışmamız kapsamındaki olguların tamamının sitogenetik analizi sonucu, 65 olguda herhangi bir sayısal ya da yapısal kromozomal abnormalite saptanmamıştır. Bulgularımız bu anlamda literatürle uyumludur. Bir olguda mozaik X kromozomu anöploidisi tespit edilmiştir. Düşük oranda mozaik olarak saptanan X kromozom anöploidileri hastalık fenotipini açıklamamaktadır. Literatüre bakıldığında zaman Mülleryan aplazili olgularda X kromozomu ilişkili izokromozom, anöploidi, parsiyel delesyonlar,

disentrik yapı gibi kromozomal aberasyonlar saptanmıştır (32-35). Mülleryan aplazili olgularda nadir de olsa otozomal kromozom abnormaliteleri de saptanmıştır. 1988 yılında Kucheria ve arkadaşlarının tanımladığı Mülleryan kanal yokluğu olan bir olguda t(12;14) belirlenmiştir (29). 2007 yılında Bendavid ve arkadaşları ise bir anne ve kızının karyotipini 46,XX,del(4)(q34→qter) şeklinde saptamışlardır. Annede bilateral Fallop tüpü seröz karsinoması varken, kızı konjenital uterus ve vajina yokluğundan etkilenmiştir (31). Çalışmamız kapsamında dizi analizi yapılan bazı hedef genlerin çıkış noktası olan, bir Amerikalı Mülleryan aplazili olguda saptanan 46,XX,t(3;16)(p22.3;p13.3) bulgusu da literatüre katkı yapacak nitelikte olup yeni aday genlerin bulunması açısından oldukça önemlidir.

Projemiz kapsamında, sitogenetik olarak normal 19 olgunun, bir oligo-SNP array sistemi olan Affymetrix Cytoscan HD platformu ile tüm genomu, CNV açısından analiz edilmiştir. Affymetrix Cytoscan HD platformu; 750.000 SNP probu, 1.9 milyon non-polimorfik prob içeren oldukça yüksek çözünürlü bir sistemdir. Bu platformda genomun tamamına yayılmış, hem SNP hem de non-polimorfik problemler olması, elde edilen verinin doğruluk olasılığını arttırmaktadır. Non-polimorfik oligo problemler ile saptanan varyant genomik bölgenin, SNP problemleri ile de doğrulanması varyasyonun çift kontrol yapılarak belirlenmesini sağlamaktadır.

CNV analizi yapılan 19 Mülleryan aplazili Türk olgunun dördünde (%21), beş farklı olası patolojik genomik varyasyon saptanmıştır. 2008 yılında Cheroki ve arkadaşları 14 olgunun %29'unda varyasyon tespit etmişlerdir (38). Nik-Zainal ve arkadaşları 2011 yılında 63 olgunun %14'ünde, Sandbacka ve arkadaşları 2013 yılında 50 Finli olgunun %16'sında CNV saptamışlardır (44, 47). McGowan ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada da, 11 olgu içerisinde CNV saptanma oranı %36 olarak bulunmuştur (17). Bulgularımız, CNV sayısı açısından literatür ile karşılaştırıldığı zaman, fark oluşturmamaktadır.

Yaptığımız CNV analizi ile, MA-56 nolu olguda 1p31.1 lokusunda mikroduplikasyon saptanmıştır. 263 Kb büyüklüğündeki bu duplikasyon bölgesinde; MutS Homolog 4 (*MSH4*), Ankyrin repeat and SOCS box containing 17 (*ASB17*), ST6-N-acetylgalactosaminidealpha-2,6 sialyltransferase 3 (*ST6GALNAC3*) olmak üzere üç gen bulunmaktadır. Mülleryan aplazili olgularda bu lokusta daha önce tanımlanmış delesyon ya da duplikasyon yoktur, olgumuz bu mikroduplikasyonu taşıyan ilk olgudur. Mikroduplikasyon bölgesinde lokalize genlere bakıldığı zaman; *MSH4* geni protein ürünü, DNA tamirinde görev alan bir protein ailesi üyesidir. Mayoz 1'de homolog kromozomların resiprokal translokasyonlarını ve yavru hücrelere doğru bir şekilde dağılmalarını düzenlemektedir (77). Bu genin dişi üreme sistemi ile ilişkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. *ASB17* ise ubiquitinasyonda görev aldığı bilinen bir proteindir. Bu proteinin fonksiyonunun tanımlanmasına yönelik kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. *ST6GALNAC3* geni protein ürünü. Gangliozid GD1A'nın, GM1B'den

biyosentezinde görev almaktadır. Golgi aygıtında lokalize bir proteindir. Galaktoz içermesi açısından, galaktoz metabolizması ile ilişkisi araştırılması anlamlıdır. Bilindiği üzere, *GALT* geni Mülleryan aplazi ile ilişkisi araştırılmış bir aday gendir (53).

Çalışmamız kapsamında belirlediğimiz mikroduplikasyonlardan bir diğeri de, MA-29 nolu olguda saptadığımız 13q14.11 lokusundaki duplikasyondur. Literatüre göre, Mülleryan aplazili olgularda bu varyasyon daha önce saptanmamıştır. Duplikasyon bölgesinde, Forkhead ailesi transkripsiyon faktörlerinden birini kodlayan Forkhead Box O1 (*FOXO1*) geni lokalizedir. *FOXO1*'in tam olarak fonksiyonu tanımlanmış değildir. Miyojenik büyüme ve farklılaşmada rol oynayabileceği düşünülmektedir. 2014 yılında yapılan bir çalışma ile gastrik kanserde NFkB'yi inhibe ettiği de bulunmuştur (78). Mülleryan kanalı gelişimi ile ilişkisi yönünde herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Projemizde yer alan bir olguda Xq25'de bir mikrolelesyon belirlenmiştir. Literatürde, Mülleryan aplazili olgularda yapılan çeşitli CNV çalışmaları sonucu, X kromozomunu ilgilendiren mikrolelesyon ve mikroduplikasyonlar tanımlanmıştır. 2008 yılında Cheroki ve arkadaşları bir Mülleryan aplazili olguda Xp21.31 bandında delesyon belirlemişlerdir (38). Ledig ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışma ile de Xp11.1'de delesyon, Xp11.3, Xp22.2, Xq22.3'de duplikasyon saptanmıştır (79). X kromozom DNA'sının parsiyel kopya sayısı değişimlerini gösteren bu bulgular, belirli bir DNA bölgesini işaret etmemektedir. Daha çok hasta analiz edilerek, X kromozomu üzerindeki hastalıkla ilişkili aday genomik bölgenin belirlenmesi mümkün olabilecektir.

Çalışmamız kapsamında, 16 nolu kromozomu ilgilendiren iki farklı mikrolelesyon belirlenmiştir. Bunlardan biri, MA-22 nolu olguda saptanan 16p11.2 bölgesindeki mikrolelesyondur. 746 Kb'lik bir DNA parçasının kaybına neden olmaktadır bölgede lokalize bilinen 44 gen bulunmaktadır. 16p11.2 mikrolelesyonunun bir başka önemi ise, Nik-Zainal ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan çalışma ile Mülleryan aplazili dört olguda, Sandbacka ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile de bir olguda aynı bölgede delesyonlar saptanmasıdır (44, 47). Nik-Zainal ve arkadaşlarının çalışmasında 25'i sendromik (Tip 2 Mülleryan aplazi), 38 izole (Tip 1 Mülleryan aplazi) Mülleryan aplazili olmak üzere 63 olgunun CNV analizi yapılmıştır. 16p11.2 mikrolelesyonu saptadıkları dört olgudan ikisi sendromik, ikisi de izole vakalardır (44). Sandbacka ve arkadaşları, 50 izole Mülleryan aplazili olguda CNV analizi yapmışlardır. Olgulardan birinde 16p11.2 mikrolelesyonu saptamışlardır (47). Bizim olgumuz ise, izole tip olan Tip 1 Mülleryan aplazi tanılıdır. 16p11.2 lokusundaki mikrolelesyonlar bugüne değin yapılan çalışmalarca, otizm (80), epilepsi, gelişme geriliği, öğrenme bozukluğu, dismorfizm/konjenital anomaliler (81) ve obezite (82) gibi çeşitli fenotipteki hastalarda saptanmıştır. Son bulgular ve bizim verilerimize göre, bu anomali ve hastalıklar listesine Mülleryan aplaziyi de eklemek yanlış olmayacaktır. Spesifik bir genomik varyasyonun nasıl bu kadar çeşitli hastalığa sebep olduğu araştırmacıların merak konusudur. Etken olabilecek başka faktörlerin varlığı (second hits) hipotezlerden bir tanesidir (44).

Çalışmamız kapsamında, literatürde yer alan beş olgu ve bizim tespit ettiğimiz olgudaki delete bölgenin kapsadığı DNA bölgesi karşılaştırılmıştır. Nik-Zainal ve arkadaşlarının belirlediği 16p11.2 mikrolelesyonlarından üçü 550 Kb, biri 600 Kb, Sandbacka ve arkadaşlarının olgusundaki varyasyon ise 530 Kb büyüklüğündedir. Bizim olgumuzla beraber altı olgunun delete bölgesinin kesişimi yaklaşık 429 Kb uzunluğunda bir DNA parçasına tekabül etmektedir. Kesişim bölgesinde lokalize; *SPN*, *QPRT*, *C16orf54*, *ZG16*, *MAZ*, *KIF22*, *PRRT2*, *PAGR1*, *MVP*, *CDIPT*, *SEZ6L2*, *ASPHD1*, *KCTD13*, *TMEM219*, *TAOK2*, *HIRIP3*, *INO80E*, *DOC2A*, *FAM57B*, *C16orf92*, *ALDOA*, *PPP4C*, *TBX6*, *YPEL3*, *GDPD3*, *MAPK3* genleri olmak üzere 26 gen bulunmaktadır. Bu genlerden *KIF22* ve *TAOK2*'nin protein ürünleri, Aktin ilişkili protein T1 (*ACTRT1*) gibi intraselüler matriks organizasyonunda görev almaktadırlar. *ACTRT1*, bir olgumuzda saptanan Xq25 mikrolelesyon bölgesinde lokalize olan tek gendir. *KIF22* proteini mikrotübül bağımlı moleküler motorlardan biri olup, hücre içi organel transportu ve hücre bölünmesi sırasında kromozom hareketinde rol almaktadırlar. *KIF22* geni mutasyonları iskelet dispilazilerinin bir grubunda saptanmış, *KIF22*'nin iskelet gelişiminde önemli olduğu düşünülmektedir (83). *PSK*, *PSK1*, *TAO2* olarak da adlandırılan *TAOK2* geni ise aktin sitoskeleti organizasyonu, mikrotübül organizasyonu ve stabilitesi, hücre sinyalleşmesi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynayan bir serin-treonin protein kinaz kodlamaktadır (84). Aynı zamanda, MAP Kinaz Kinaz Kinaz (*MAPKKK*) ailesi üyesidir. Otizm ve şizofreni ile ilişkilendirilen *TAOK2*'nin, 2012 yılında Anda ve arkadaşları bazal dendrit oluşumunda rol aldığını göstermişlerdir (85).

16p11.2 mikrolelesyonuna sahip beş olgudaki ortak varyant bölgedeki genlerden olan *TBX6* geni Mülleryan aplazi ile ilişkilendirebilme açısından öne çıkmaktadır. White ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada, farelerde *Tbx6*'nın paraksiyel mezodermin gelişiminde rol oynadığını göstermişlerdir. Bir transkripsiyon faktörü olan *Tbx6*'nın Notch ligandının ekspresyonunun regülasyonunu sağladığını bulmuşlardır. Notch sinyal yolağının embriyolojik gelişimdeki önemi iyi tanımlanmıştır. *Tbx6*'nın paraksiyel mezoderm üzerine etkisini gösteren araştırmacılar, Mülleryan kanal ile spesifik bir ilişkisi olduğunu belirlememişlerdir (48). Ancak ilerleyen yıllarda yapılan çalışmaların sonuçları *TBX6* ve Mülleryan kanal gelişiminin ilişkili olabileceği hipotezini doğrular yönde olmuştur. Sandbacka ve arkadaşları 2013 yılında, bir Mülleryan aplazili olguda 16p11.2 mikrolelesyonu saptamaları üzerine, bu bölgedeki varyasyon birikimine dikkat çekmiş ve 112 Finli olgu ve 200 kontrol bireyde *TBX6* geni mutasyonlarını araştırmışlardır. *TBX6* geni tüm ekzon ve ekzon-intron bağlantı bölgelerini Sanger dizileme tekniği ile dizi analizi yapmışlardır. İki olguda, daha önce literatürde tanımlanmamış, evrimsel açıdan oldukça korunmuş bir bölgede heterozigot kırılma mutasyonu (c.622-2A>T) saptamışlardır. Bu mutasyon kontrol bireylerin hiçbirinde tespit edilmemiştir. Mutation Taster, SplicePort, Human Splicing Finder, Spliceman programları ile test edilen mutasyonun büyük olasılıkla patolojik olduğu ve ekzon 5'in kaybına yol açacağını bulmuşlardır (47). Dolayısı ile; 16p11.2 mikrolelesyonu taşıyan tüm olgularda saptanan ortak delete bölgedeki genlerden en önemlisi günümüz verilerine göre *TBX6* genidir. Öncelikle *TBX6* ve diğer genlerin Mülleryan aplazi ilişkisinin ileri çalışmalar ile araştırılması, hastalığın genetik temelini

açıklamaya yarar sağlayabilecektir.

Saptadığımız bir diğer CNV, MA-23 nolu olguda belirlenen 16p13.3 lokusundaki mikrolelesyonudur. Mülleryan aplazili olgularda saptanan ilk 16p13.3 mikrolelesyonudur. Delesyona uğramış bölgede yalnızca RNA binding protein, fox-1 homolog (*C. elegans*) 1 (*RBFOX1*) geni lokalizedir. Bir mRNA kırılma faktörü olan, *RBFOX1* geni protein ürünü oldukça korunmuştur ve metazoalarda alternatif kırılma regülasyonu yaptığı bilinmektedir. Nöral gelişimde önemli olduğu saptanan *RBFOX1*'in otizm ile ilişkisi konusunda çalışmalar vardır (86). Uterus ve overlerde ekspresyonu düşük olan proteinin Mülleryan kanal gelişimindeki rolü ile ilgili bugüne kadar herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Ancak, *RBFOX1* geni knock-out edilen farelerde fertilité oranında bir düşüş belirlenmiştir (87).

16p11.2 bölgesinde mikrolelesyon saptadığımız MA-22 nolu olguda, Xq25 mikrolelesyonu da belirlenmiştir. Olgumuzda X kromozomunda saptadığımız mikrolelesyon 768 Kb büyüklüğünde ve yalnızca Aktin ilişkili protein T1 (Actin Related Protein T1/*ACTRT1*) genini içermektedir. Saptadığımız en büyük delesyon olmasına karşın gen bakımından fakir bir bölgedir. *ACTRT1* proteini, bir sitoskelet protein olan beta aktin ile ilişki halindedir. Memeli sperminin baş kısmında perinükleer tekadaki kaliksin major bileşenlerinden biridir. Bu yüzden sperm formasyonunda görev aldığı düşünülmektedir. İnsan Protein Atlası (Human Protein Atlas) ve Genecards veritabanlarına göre, *ACTRT1* protein ekspresyonu endometrial stromada düşük oranda iken serviks, uterus ve böbrekte *ACTRT1* proteini saptanmamıştır. Bu bulgu, Mülleryan aplazi ve *ACTRT1* geni ilişkisini zayıflatmaktadır. Diğer taraftan Xq25 delesyonuna sahip olguda, başka bir CNV saptamış olmamız da, fenotipe yol açan varyasyonun tek başına Xq25del olması ihtimalini de düşürmektedir. DGV veritabanı verilerine göre, Xq21.1 ve Xq28 arası DNA bölgesini kapsayan delesyona sahip gonadal disgenezisi olan bir olgu tespit edilmiştir. Bu bölgede, *ACTRT1* geninin de içinde bulunduğu 100'ün üzerinde gen lokalizedir. Gonadal disgenezise sebep olan gen ya da genleri belirlemek bu anlamda oldukça zordur. Bu bulgu gonadal disgenezis ve otozomal genom varyasyonlarını da dışlamamaktadır. Bugüne değin, *ACTRT1* geni mutasyonlarını tanımlamaya yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır. *ACTRT1* geninin knock-out olduğu hayvan modeli de oluşturulmamıştır. Bu genin protein ürününün fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemektedir.

Saptadığımız mikrolelesyon ve mikroduplikasyon bölgelerindeki gen ya da genler hastalık etkeni olma potansiyeline sahiptir. Ancak, delete ya da duplike bölgelere yakın genlerin de transkripsiyonel regülasyonu değişebileceğinden, komşu genlerin de işe karışabileceği unutulmamalıdır. Bunun için daha geniş kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

Bugüne kadar CNV açısından değerlendirilmiş MRKH sendromlu olguların verilerine göre; 1q21.1, 17q12, 22q11.2 ve 16p11.2 bölgelerindeki CNV'ler öne

çıkılmaktadır. Ancak yapılan çalışmaların sonuçları birbirleriyle çok tutarlı değildir ve hastalığın altında yatan nedenleri tam olarak tanımlayamamaktadır. Yeni nesil dizileme tekniğinin gelişmesi ile tüm genom ya da çok sayıda genin kısa sürede dizilenmesi mümkün olabilmekte, Mülleryan aplazi gibi genetik olarak heterojen hastalıkların genetik kökenini açıklamak için umut olmaktadır (49).

Diğer taraftan heterozigosite kaybı/homozigosite çalışmaları, son yıllarda hastalıkla ilişkili olabilecek genomik bölgeleri belirlemek için uygulanmaktadır. Çalışmamızda da Affymetrix CytoscanHD platformundaki SNP problemleri aracılığıyla 19 olguda homozigosite haritalaması yapılmıştır. Amacımız, akraba evliliğinin oldukça yaygın olduğu ülkemizde, homozigot bölgeleri daha sıklıkla saptama ihtimalizden yola çıkarak, hastalıkla ilişkili resesif genleri belirlemektir. 19 olguda, özellikle ebevenyleri akraba olanlarda genomda büyük oranda homozigot bölgeler tespit edilmiştir. Ancak, tek bir genomik bölgeye kadar indirgeme yapılamamıştır. Bunun için daha çok sayıda hasta ve aile breyleri analiz edilerek, resesif kalıtılan varyasyonlara sahip genlerin bulunma şansı artacaktır. Akraba evliliği oranının yüksek olduğu ülkemizde homozigosite çalışmaları ile hastalıkların etyopatogenezinin aydınlatılması daha mümkündür. Ayrıca literatürde, bugüne kadar Mülleryan aplazili olgular ile yapılmış homozigosite haritalaması çalışması bulunmamaktadır.

Projemiz kapsamında, *WNT4*, *CNOT10*, *TRIM71*, *ZNF200*, *ZNF213*, *ORIF1*, *FAM190A*, *CHSY3*, *LRRTM3*, *CTNNA3*, *HNF1B* ve *LHX1* genleri olmak üzere 12 genin tüm ekzonlarının dizi analizi yapılmıştır. Bu genlerden *WNT4*, *HNF1B* ve *LHX1*'in Mülleryan aplazi ile ilişkisini aydınlatmaya yönelik çalışmalar literatürde mevcutken, diğer dokuz gen ilk olarak bu çalışma ile olası aday genler olarak araştırılmıştır. Literatüre bakıldığı zaman, Mülleryan aplazi ile ilişkisi en detaylı araştırılan genlerin başında Wingless-type MMTV integration site family, member 4 (*WNT4*, NM_030761.4) *WNT4* gelmektedir. Çünkü, günümüze kadar hastalıkla ilişkisi gösterilen tek genidir. *WNT4* proteini, nüklear reseptörü ile integrasyonu sonucu, testis belirleyici faktöre antagonist etki göstererek dişi yönünde gelişim ve testis oluşumunun engellenmesinde önemli rol oynamaktadır. *Wnt4* knock-out hayvan modellerinde gonadal gelişimin olmadığı gösterilmiştir (55). Çalışmamızda, Mülleryan aplazi tanısı almış 19 Türk olguda *WNT4* geninin dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Ancak herhangi bir varyasyon saptanmamıştır. 2012 yılında Chang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da 15 Çinli Mülleryan aplazili olgunun *WNT4* genlerinde mutasyon saptanmamıştır (88). Bakıldığı zaman, *WNT4* geni defektleri hiperandrojenizmin eşlik ettiği Mülleryan aplazili bireylerde daha çok görülmektedir. Bu da Mülleryan aplazi fenotipi ile çoğunlukla ilişkili değildir (47). Mülleryan aplazi ve *WNT4* geni ilişkisinin tam olarak aydınlatılması için daha çok olgu ile çalışma yapılması ve fonksiyonel çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Dizi analizi yapmak üzere hedef gen olarak belirlediğimiz genlerden bazıları, t(3;16) aberasyonunda işe karışan 3 ve 16 nolu kromozomlarının kırık noktasında ya da yakınında lokalize olan genlerdir. Hipotezimize göre, bu genlerden biri ya da birkaçı Mülleryan kanal gelişiminde rol alma potansiyeline sahiptir. Bu genlerden 3p23.3'de lokalize *CNOT10* geni, CCR4-NOT Transkripsiyon Kompleksinin bir altünitesini (Subünite 10) kodlamaktadır. CCR4 genleri ilk olarak *Saccharomyces cerevisiae*'de transkripsiyonel regülasyon araştırmaları sırasında keşfedilmiş, birkaç yıl sonra CCR4 proteinlerinin NOT proteinleri ile kompleks oluşturdıkları belirlenmiştir. CCR4-NOT kompleksinin temel görevi mRNA degradasyonudur. Ayrıca mikro RNA (miRNA) aracılı baskılama ve transkripsiyonel regülasyonda da görev aldığı bilinmektedir (89). *CNOT10* geninin herhangi bir insan hastalığındaki rolü henüz araştırılmamıştır. Ekspresyon profiline bakıldığı zaman, *CNOT10*'un hem mRNA hem de protein düzeyinde, dişi üreme sistemi organlarında eksprese edildiği görülmektedir (90). Çalışmamızda, 16 Mülleryan aplazili Türk olguda *CNOT10* varyasyonları araştırılmış ancak herhangi bir varyasyon bulunmamıştır. Daha çok sayıda Mülleryan aplazili olguda bu genin varyasyonlarının araştırılması, hastalıkla ilişkisinin aydınlatılmasına yarar sağlayacaktır. 3p23.3'de lokalize olan bir diğer gen *TRIM71*'dir. TRIM71 proteini miRNA'lara bağlanarak ve Argonaute protein 2 (AGO2) ile interaksiyon yaparak posttranskripsiyonel baskılamada görev almaktadır. Embriyonik kök hücrelerde eksprese edilen *TRIM71*'in, nöral projenitör hücrelerin proliferasyonu ve prematür farklılaşmasının önlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (91, 92). SHCBP1'in stabilitesini kontrol ederek FGF sinyal yolağını pozitif olarak regüle etmektedir. Over ve testis dokularında eksprese edilen *TRIM71*'in uterus, serviks ve vajinada ekspresyonu gözlenmemektedir. Translokasyona karışan 16 nolu kromozomun kırık noktasında (16p13.3) lokalize çinko parmak motifi içeren *ZNF200*, *ZNF213* genleri ile *ORIF1* de, çalışmamız kapsamında olası aday genler olarak değerlendirilmiştir. *ZNF200* ve *ZNF213* genlerinin henüz tam olarak fonksiyonları bilinmemektedir. Ancak yapıları itibari ile DNA'ya bağlanarak fonksiyon gösterdikleri düşünülmektedir. 1999 yılında Chen ve arkadaşlarının Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) hastalığı ilişkili genomik bölgeyi tanımlamak amacıyla yaptığı transkripsiyonel haritalamada, aday bölge olarak 16p13.3 lokusu bulunmuştur (93). Bu genlerin FMF ile ilişkisini açıklayacak ek araştırmalar henüz yapılmamıştır. Bu bölgede lokalize, *ORIF1* geni ise G protein bağlı reseptörlerden olan olfaktör reseptör ailesinin bir üyesini kodlamakta ve koku duyusunun oluşumunda fonksiyon görmektedir. Bu genlerin gelişimsel basamaklardaki fonksiyonları henüz bilinmemektedir. Çalışmamız kapsamında Mülleryan aplazili olgularda bu genlerde değişim saptanmamıştır. 16p13.3 bölgesi ile ilgili olarak, CNV analizi ile saptadığımız 16p13.3 mikrolelesyonu, söz konusu kırık bölgesinin downstreaminde olup *ZNF200*, *ZNF213* ve *ORIF1* genlerini içermemektedir. Ancak bu bölgeyi ilgilendiren iki abnormalite bulunması da ilginçtir. Bu durum, 16p13.3 bölgesinde, delesyon ve kırık noktadan etkilenmiş gen ya da genlerin hastalığın gelişiminde rol oynayabileceği şüphesini arttırmaktadır.

Çalışmamızda yaptığımız dizi analizi ile *FAM190A* geninde, bir olguda c.2117A>G (p.Lys706Arg) varyasyonu saptanmıştır. Pozitif yüklü bir aminoasit olan Lizinin, pozitif

yüklü bir diğer aminoasit olan Arjinine dönüşümüne neden bu nükleotid değişiminin protein fonksiyonu üzerine önemli bir etki etmesi beklenmemektedir. Bu nonsinonim varyasyonun, *FAM190A* geni DNA dizisinin belirlenmesi ile ilgili genomik çalışmaların devam etmesi nedeni ile SIFT analizi yapılamamıştır. Genel olarak bakıldığında, *FAM190A* fonksiyonu henüz tam belli olmayan bir gendir. Üreme sistemi gelişimi ile ilgili daha önce hiç çalışılmamıştır. Bu genin Mülleryan aplazi ile olası ilişkisini aydınlatmak için çok sayıda olgudaki genetik değişimleri incelenmelidir.

Hedef genlerimizden *CHSY3*, kondroitin polimerinin uzamasında rol oynayan, glukroniltransferaz ve N-asetilgalaktozaminiltransferaz aktiviteleri olan bir glikozil transferaz enzimidir (94). Kalathas ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları bir çalışma ile, Kolorektal karsinomaları hastalarda normal bireylere göre Kondroitin sentaz 3'ün ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur (95). Uterus, serviks, fallop tüpleri ve endometriumun glandular hücreleri ile renal tübüllerde ekspresyonu gösterilen *CHSY3* proteinin ürogenital sistem gelişimi ile ilişkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır (73). 19 Mülleryan aplazili olguda *CHSY3* geninin tüm ekzon dizi analizinde herhangi bir genetik değişim saptanmamıştır. Bu durum olgu sayısının azlığı kaynaklı olabilir. Daha çok sayıda olgunun taranması *CHSY3* ve Mülleryan aplazi ilişkisinin aydınlatılması açısından yarar sağlayacaktır.

10q21.3'de lokalize olan, dizi analizi ile nükleotid değişimlerini araştırdığımız genlerden bir diğeri de *LRRTM3* genidir. *LRRTM3*'ün fonksiyonuna bakıldığı zaman, sinir sistemi gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. *LRRTM3* gen varyasyonları başta ileri yaş Alzheimer hastalığı olmak üzere otizm ile de ilişkilendirilmiştir (96, 97). Çalışmamızda, dizi analizi ile incelediğimiz *LRRTM3* geninde herhangi bir varyasyon saptanmamıştır. Endometrium ve Fallop tüplerinde eser miktarda ekspresyonu bulunan *LRRTM3* geninin (98), üreme sistemi gelişimi üzerine etkisi ile ilişkili başka referans çalışma bulunmamaktadır. Kas hücrelerinde hücre-hücre adezyonunda rol oynayan bir katenin proteini kodlayan *CTNNA3* geni 10q21.3'de lokalize hedef genlerimizden diğeridir. *CTNNA3* proteininin epitelyal hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasında görev almasının yanı sıra kanser hücre motilitesini de indüklediği bilinmektedir (99). Literatürde, bu gendeki mutasyonlar aritmojenik sağ ventriküler displazi ile ilişkilendirilmiştir (74). *CTNNA3* genini aynı zamanda Alzheimer ve otizm gibi nörolojik hastalıklarla ilişkilendiren çalışmalar da mevcuttur (100, 101). Çalışmamızda yer alan bir olgunun *CTNNA3* geninde c.1732+13C>T olmak üzere bir intronik SNP belirlenmiştir. Bu varyasyonun tekrar doğrulaması yapılacaktır. İtronik bölgeler yakın geçmişe kadar non-fonksiyonel olarak kabul edilseler de son yıllarda, fonksiyonel küçük RNA dizilerinin sentezlendiği bölgeler olarak karşımıza çıkmaktadır. Olgumuzda tespit edilen varyasyon mRNA kırılma sürecini etkilememekte ancak, bu diziden sentezlenen muhtemel RNA dizisi aracılığıyla gen regülasyonu üzerine etki edebilir. Ayrıca, bazı spesifik mRNA kırılmasını regüle eden proteinler, intronik dizileri tanıyarak kırılma etkinliğini düzenlemektedirler. Bu intronik diziler, mRNA kırılması için donör ve akseptör nükleotidler dışındaki bölgelerde yer almaktadır. Dolayısıyla her intronik SNP,

alternatif kırılma ve kırılma etkinliği açısından araştırılabilir. Olgumuzda saptanan bu varyasyonun kantitatif RT-PZR yöntemi ile alternatif kırılmaya yol açıp açmadığı tespit edilebilir (102). Ayrıca olgumuzda belirlenen varyasyonun aile bireylerinde taranması sonucu *de novo* bir varyasyon olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, *CTNNA3* geni gerek hücre proliferasyonu gerekse hücre motilitesini etkileyen bir protein olması sebepleriyle de çalışmamızdaki en potansiyel aday genlerden biridir. Renal tübüllerde daha fazla olmak üzere uterusda da eksprese edilen *CTNNA3*'nin (103) ileri çalışmalar yapılarak üreme sistemi gelişimindeki rolü araştırılmalıdır.

Belirlenen aday genlerden *HNF1B* geninin, hasta grubumuzun tamamı olan 66 olguda dizi analizi yapılmıştır. Beş olgunun intron 2 bölgesinde c.545-49_50insTGTC, beş olgunun intron 8 bölgesinde ise c.1535+47_48insC varyasyonu saptanmıştır. Her iki varyasyonun ailesel geçiş göstermesi patolojik olmadıklarını düşündürmektedir. Ancak bulgularımız *HNF1B*'nin Mülleryan aplazi gelişimindeki muhtemel rolünü dışlamamaktadır. Mülleryan aplazi ile ilişkili olarak en potansiyel aday genlerden biri olan *HNF1B*, nefron ve pankreas gelişiminde önemli rol oynayan bir transkripyon faktörünü kodlamaktadır. *HNF1B* geni ve Mülleryan aplazi ilişkisini güçlendirecek literatür verileri bulunmaktadır. 1999 yılında Lindner ve arkadaşları beş kişiden oluşan hafif diyabetli, ilerleyen böbrek rahatsızlığı ve ciddi genital malformasyonları olan Norveçli bir ailede, *HNF1B* geninin ekzon 2 bölgesinde 75 bp'lik bir delesyon saptamıştır. Bu delesyonu taşıyan dört dişi bireyin ikisinde Mülleryan aplazi mevcut olduğunu belirlemişlerdir (104). Haumaitre ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları çalışmada ise, normal karyotipe sahip ancak *HNF1B* mutasyonu taşıyan bir bireyin postmortem incelemesi sonucu bilateral büyük kistik böbrekler, pankreas hipoplazisi ve hepatomegalinin yanı sıra, bir Mülleryan kanal gelişim bozukluğu olan uterus didelfise sahip olduğu bulunmuştur (105). *HNF1B* geni ürünü embriyo gelişimi için hayati öneme sahiptir. *HNF1B* knock-out hayvan modelleri, embriyonik dönemlerinin 7,5. gününde ekstraembriyonik visseral endodermin gelişmemesi nedeni ile ölmektedirler (106). Ayrıca *HNF1B* ve projemiz kapsamında hedef genlerimizden biri olan *LHX1* genini de kapsayan 17q12 bölgesinde, bugüne kadar toplamda 10 Mülleryan aplazili olguda CNV saptanmıştır (38, 39, 44, 79). Bu spesifik genomik bölgede belirlenen CNV'ler, Mülleryan aplazili olgularda en sık saptanan varyasyonlardandır. Literatür verilerinin de incelenmesiyle ürogenital sistem gelişimde rol oynadığı düşünülen *HNF1B* genindeki varyasyonların, daha geniş hasta gruplarında mutasyonlar açısından değerlendirilmesi önem kazanmaktadır.

17q12 bölgesinde lokalize bir diğer hedef gen, *LHX1* genidir. Homeobox DNA bağlayıcı domain içeren, bir transkripsiyon faktörü olan gen ürününün renal ve ürogenital sistem gelişiminde rol oynadığı bildirilmektedir. Beş olgunun *LHX1* geninde p.Ala388Ser (c.1162G>T) varyasyonu saptanmıştır. Saptanan varyasyonun paternal ya da maternal geçiş göstermesi ve bazı kız kardeşlerde de tespit edilmesi dolayısıyla, patolojik olduğu düşünülmemektedir. Nitekim p.Ala388Ser varyasyonunun protein fonksiyonu üzerine etkisi, SIFT analizi aracılığıyla "tolere edilebilir" olarak tahmin

edilmiştir. Literatüre göre, bugüne kadar yedi Mülleryan aplazili olgunun *LHX1* genlerinde beş mutasyon saptanmıştır (41, 47). Dolayısıyla güçlü bir aday gen olarak görülen *LHX1*'in, daha çok sayıda Mülleryan aplazili Türk olgudaki genetik değişimlerinin taranması, bu genin hastalıkla ilişkisini aydınlatma açısından oldukça önemlidir.

Çalışmamız kapsamında Mülleryan aplazili olgularda daha önce belirlenmeyen CNV varyasyonları belirlenmiştir. Bu CNV bölgeleri hastalık için olası aday genomik bölgeler olarak değerlendirilebilir. Bu bölgelerdeki genlerin detaylı incelenmesi, ileriki çalışma hedeflerimiz arasındadır. Ayrıca projemiz kapsamında dizi analizi hedeflenen, t(3;16) translokasyonu kırık noktalarında lokalize genler son derece önemlidir. Literatüre bakıldığı zaman, kromozomal abnormalitelerden yola çıkılarak birçok gelişimsel hastalığın genetik temeli aydınlatılmıştır (107). Uyguladığımız dizi analizi neticesi bu genlerde herhangi bir varyasyon bulunmamıştır. Ancak bu durum az sayıda hastanın taranması ile ilgili olabilir. Dolayısıyla, diğer hasta olgularda da bu genlerin varyasyonlarının araştırılması son derece önemlidir.

Türk Mülleryan aplazili olgularda genetik varyasyonlarının araştırılabileceği bir diğer gen *TBX6* genidir. Bu genin literatür verileri son derece heyecan vericidir. Ayrıca bir olgumuzda belirlediğimiz CNV bölgesi içerisinde yer alan bir gendir. Dolayısıyla, güçlü bir aday gen durumundaki *TBX6*'nın Türk Mülleryan aplazili olgularda da araştırılması son derece önemlidir. Gerek literatüre gerekse çalışmamızın sonuçlarına bakıldığı zaman, Mülleryan aplazinin tek gen hastalığından çok multigenik bir paterne sahip olduğu görülmektedir. Dolayısıyla bu hastalıktan sorumlu genleri bulabilmek için detaylı genom taramalarının çok sayıda hastada yapılması gerekmektedir. Projemiz kapsamında 66 olgu yer almaktadır ancak daha çok sayıda hasta örneği elimizde mevcuttur. Bu durumun, akraba evliliği oranının ülkemizde çok olmasının konjenital gelişim defektlerinin insidansının artışına neden olmasıyla ileri gelebileceğini düşünmekteyiz. Nitekim, Alper ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmada Antalya bölgesinde akraba evliliği oranının %33.9 bulunması, genetik hastalıklar açısından yüksek risk altında bir toplum olduğumuzu göstermektedir (108). Sonuç olarak daha çok sayıda Mülleryan aplazili Türk olgularda CNV analizi yapılması ve aday genlerin dizi analizi hastalığın etyopatogenezinin aydınlatılması açısından oldukça yararlı olacaktır. Elde edilen veriler de kadın üreme sistemi anomalilerinin tanı ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilecektir.

SONUÇLAR

Çalışmamız kapsamına alınan 66 Mülleryan aplazili Türk olgu ile, hastalığın etyopatogenezinin sorumlu gen/genleri araştırmayı amaçladığımız çalışmamızda;

- Sitogenetik analizi sonucu, bir olguda belirlenen düşük oranda mozaik X kromozomu anöploidisi dışında herhangi bir kromozomal abnormalite belirlenmemiştir.
- On dokuz olguda Affymetrix CytoScan HD mikrodizin platformu kullanılarak yapılan tüm genom CNV analizi ile dört olguda tespit edilen 1p31.1, 13p14.11 bölgelerindeki mikroduplikasyon ve 16p11.2, 16p13.3, Xq25 bölgelerindeki mikrolezyonlar yüksek olasılıklı patolojik CNV'ler olarak belirlenmiştir.
- Mikrodizin platformu aracılığıyla 19 olgunun tüm genomu homozigot bölgeler açısından incelenmiştir. Homozigosite analizi ile resesif genler açısından aday bölge olabilecek, olgular arasında paylaşılan ortak bir bölge bulunmamıştır.
- Literatür verileri ve işbirliği yaptığımız laboratuvarın verilerine dayanarak dizi analizi yapılmak üzere hedef 12 olası aday gen belirlenmiştir. On iki genin tüm ekzonları ve ekzonlara komşu intronik dizileri dizi analizi metoduyla incelenmiştir. Sonuç olarak *HNF1B* geni intron 2 bölgesinde c.545-49_50insTGTC (n=5), intron 8 bölgesinde c.1535+47_48insC (n=5) varyasyonları tespit edilmiştir. Beş olgunun *LHX1* geninde p.Ala388Ser (c.1162G>T) varyasyonu saptanmıştır. SIFT analizi yapılan p.Ala388Ser varyasyonunun protein fonksiyonu üzerine etkisi tolere edilebilir olarak bulunmuştur. *HNF1B* ve *LHX1* genlerinde tespit edilen varyasyonlar açısından ulaşılabilen aile bireylerinde dizi analizi yapılması ile varyasyonların ailesel geçiş gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca *FAM190A* geninde, bir olguda c.2117A>G (p.Lys706Arg) varyasyonu, bir olguda *CTNNA3* geninde c.1732+13C>T varyasyonları saptanmış ancak tekrar doğrulanması gerekmektedir.
- Çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz veriler Mülleryan aplazinin genetik temelini aydınlatılmasında önemli yer tutmaktadır. CNV analizi yapılan olgu sayısının artırılması Mülleryan aplaziden sorumlu genomik bölgelerin tanımlanması için önem taşımaktadır.
- Yüksek verimliliğe sahip yeni nesil dizileme teknolojileri bu aşamada kullanılabilecek sistemler olarak karşımıza çıkmaktadır.
- Hastalıkla ilişkili aday genlerin belirlenmesi için bir diğer yöntem homozigosite haritalamasıdır. Bu çalışma ile elde ettiğimiz bulguları ileri taşıyarak, hasta olguların aile bireylerinin de homozigosite analizinin yapılması ile aday genomik bölgeler tespit edilebilecektir. Toplumumuzda akraba evliliğinin yaygın olması, bu tür çalışmalarda etkili sonuç alma olasılığını oldukça yükseltmektedir.
- Sonuç olarak, Mülleryan aplaziden sorumlu genlerin tanımlanması üreme sistemi gelişiminde rol oynayan moleküler yolların aydınlatılmasına dolayısıyla diğer üreme sistemi hastalıklarının tanı ve tedavisine de ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Demirtas A., Piskin I., *Memelilerde cinsiyet gelişimi ve hormonal kontrolü*. Veteriner Hekim Der Derg, 2009. **80**(3): p. 23-28.
2. Wilhelm D., Palmer S., and Koopman P., *Sex determination and gonadal development in mammals*. Physiological reviews, 2007. **87**(1): p. 1-28.
3. Oppelt P., von Have M., Paulsen M., Strissel P.L., Strick R., Brucker S., Wallwiener D., and Beckmann M.W., *Female genital malformations and their associated abnormalities*. Fertility and sterility, 2007. **87**(2): p. 335-42.
4. Acien P. and Acien M.I., *The history of female genital tract malformation classifications and proposal of an updated system*. Human reproduction update, 2011. **17**(5): p. 693-705.
5. Kobayashi A. and Behringer R.R., *Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals*. Nature reviews. Genetics, 2003. **4**(12): p. 969-80.
6. Ludwin A. and Ludwin I., *Comparison of the ESHRE-ESGE and ASRM classifications of Mullerian duct anomalies in everyday practice*. Hum Reprod, 2015. **30**(3): p. 569-80.
7. Üstüner I., Keskin L., Öztürk Ö., Özyiğit E., Avşar A.F., *Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) Sendromu*. Yeni Tıp Dergisi, 2008. **25**: p. 241-244.
8. Kloosterman W.P. and Hochstenbach R., *Deciphering the pathogenic consequences of chromosomal aberrations in human genetic disease*. Mol Cytogenet, 2014. **7**(1): p. 100.
9. Vern L. Katz G.M.L., Rogerio A. Lobo, David M. Gershenson, *Comprehensive Gynecology*, ed. t. Edition. 2007: Elsevier.
10. *Female Reproductive System Diagram*.
<http://www.anatomybodypics.net/female-reproductive-system-diagram/>.
11. Moore, Persaud. The Developing Human. 2002. Sixth Edition
12. Lankford J.C., Mancuso P., and Appel R., *Congenital Reproductive Abnormalities*. J Midwifery Womens Health, 2013. **58**(5): p. 546-51.

13. Di Spiezio Sardo A., Campo R., Gordts S., Spinelli M., Cosimato C., Tanos V., Brucker S., Li T.C., Gergolet M., De Angelis C., Gianaroli L., and Grimbizis G., *The comprehensiveness of the ESHRE/ESGE classification of female genital tract congenital anomalies: a systematic review of cases not classified by the AFS system*. Hum Reprod, 2015. **30**(5): p. 1046-1058.
14. Grimbizis G.F., Gordts S., Di Spiezio Sardo A., Brucker S., De Angelis C., Gergolet M., Li T.C., Tanos V., Brolmann H., Gianaroli L., and Campo R., *The ESHRE/ESGE consensus on the classification of female genital tract congenital anomalies*. Hum Reprod, 2013. **28**(8): p. 2032-44.
15. Saravelos S.H., Cocksedge K.A., and Li T.C., *Prevalence and diagnosis of congenital uterine anomalies in women with reproductive failure: a critical appraisal*. Hum Reprod Update, 2008. **14**(5): p. 415-29.
16. Bermejo C., Martinez Ten P., Cantarero R., Diaz D., Perez Pedregosa J., Barron E., Labrador E., and Ruiz Lopez L., *Three-dimensional ultrasound in the diagnosis of Mullerian duct anomalies and concordance with magnetic resonance imaging*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2010. **35**(5): p. 593-601.
17. McGowan R., Tydeman G., Shapiro D., Craig T., Morrison N., Logan S., Balen A.H., Ahmed S.F., Deeny M., Tolmie J., and Tobias E.S., *DNA copy number variations are important in the complex genetic architecture of mullerian disorders*. Fertil Steril, 2015. **103**(4): p. 1021-1030 e1.
18. Elyan A S.M., *Müllerian Duct Anomalies: Clinical Concepts*. Ain Shams Journal of Obstetrics and Gynecology, 2004. **1**: p. 11-20.
19. Oppelt P.G., Lermann J., Strick R., Dittrich R., Strissel P., Rettig I., Schulze C., Renner S.P., Beckmann M.W., Brucker S., Rall K., and Mueller A., *Malformations in a cohort of 284 women with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome (MRKH)*. Reproductive biology and endocrinology : RB&E, 2012. **10**: p. 57.
20. CAJ M., *Über Verdopplung des Uterus und ihre Arten, nebst Bemerkungen über Hasenscharte und Wolfsrachen*. J Chir Augenheilk, 1829(13): p. 525-564.
21. Rokitansky C.v., *Über die sogenannten Verdopplungen des Uterus*. Med Jahrb Öst Staat, 1838. **26**: p. 39-46.
22. Küster H., *Uterus bipartitus solidus rudimentarius cum vagina solida*. Z Geburtshilfe Gynakol, 1910. **67**: p. 692–718.

23. Hauser G.A., Keller M., Koller T., and Wenner R., [*The Rokitansky-Kuester-syndrome. Uterus bipartitus solidus rudimentarius cum vagina solida*]. Gynaecologia, 1961. **151**: p. 111-2.
24. Morcel K., Camborieux L., and Guerrier D., *Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome*. Orphanet journal of rare diseases, 2007. **2**: p. 13.
25. Patnaik S.S., Brazile B., Dandolu V., Ryan P.L., and Liao J., *Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome: a historical perspective*. Gene, 2015. **555**(1): p. 33-40.
26. Chandiramani M., Gardiner C.A., Padfield C.J., and Ikhen S.E., *Mayer - Rokitansky - Kuster - Hauser syndrome*. Journal of obstetrics and gynaecology: the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology, 2006. **26**(7): p. 603-6.
27. Klipstein S., Bhagavath B., Topipat C., Sasur L., Reindollar R.H., and Gray M.R., *The N314D polymorphism of the GALT gene is not associated with congenital absence of the uterus and vagina*. Molecular human reproduction, 2003. **9**(3): p. 171-4.
28. Rall K., Barresi G., Walter M., Poths S., Haebig K., Schaeferhoff K., Schoenfisch B., Riess O., Wallwiener D., Bonin M., and Brucker S., *A combination of transcriptome and methylation analyses reveals embryologically-relevant candidate genes in MRKH patients*. Orphanet journal of rare diseases, 2011. **6**: p. 32.
29. Kucheria K., Taneja N., and Kinra G., *Autosomal translocation of chromosomes 12q & 14q in mullerian duct failure*. Indian J Med Res, 1988. **87**: p. 290-2.
30. Ogata T., Muroya K., Sasagawa I., Kosho T., Wakui K., Sakazume S., Ito K., Matsuo N., Ohashi H., and Nagai T., *Genetic evidence for a novel gene(s) involved in urogenital development on 10q26*. Kidney Int, 2000. **58**(6): p. 2281-90.
31. Bendavid C., Pasquier L., Watrin T., Morcel K., Lucas J., Gicquel I., Dubourg C., Henry C., David V., Odent S., Leveque J., Pellerin I., and Guerrier D., *Phenotypic variability of a 4q34-->qter inherited deletion: MRKH syndrome in the daughter, cardiac defect and Fallopian tube cancer in the mother*. European journal of medical genetics, 2007. **50**(1): p. 66-72.
32. Guitron-Cantu A., Lopez-Vera E., Forsbach-Sanchez G., Leal-Garza C.H., Cortes-Gutierrez E.I., and Gonzalez-Pico I., *Gonadal dysgenesis and Rokitansky syndrome. A case report*. The Journal of reproductive medicine, 1999. **44**(10): p. 891-3.

33. Gardo S., Papp Z., and Gaal J., *XO-XX Mosaicism in the Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. Lancet, 1971. **2**(7738): p. 1380-1.
34. Phansey S.A., Tsai C.C., and Williamson H.O., *Vaginal agenesis in association with gonadal dysgenesis*. Obstetrics and gynecology, 1981. **57**(6 Suppl): p. 56S-7S.
35. De Leon F.D., Hersh J.H., Sanfilippo J.S., Schikler K.N., and Yen F.F., *Gonadal and mullerian duct agenesis in a girl with 46,X,i(Xq)*. Obstet Gynecol, 1984. **63**(3 Suppl): p. 81S-83S.
36. Marcinkowska-Swojak M., Uszczynska B., Figlerowicz M., and Kozlowski P., *An MLPA-based strategy for discrete CNV genotyping: CNV-miRNAs as an example*. Hum Mutat, 2013. **34**(5): p. 763-73.
37. McCarroll S.A. and Altshuler D.M., *Copy-number variation and association studies of human disease*. Nature genetics, 2007. **39**(7 Suppl): p. S37-42.
38. Cheroki C., Krepischi-Santos A.C., Szuhai K., Brenner V., Kim C.A., Otto P.A., and Rosenberg C., *Genomic imbalances associated with mullerian aplasia*. Journal of medical genetics, 2008. **45**(4): p. 228-32.
39. Bernardini L., Gimelli S., Gervasini C., Carella M., Baban A., Frontino G., Barbano G., Divizia M.T., Fedele L., Novelli A., Bena F., Lalatta F., Miozzo M., and Dallapiccola B., *Recurrent microdeletion at 17q12 as a cause of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome: two case reports*. Orphanet journal of rare diseases, 2009. **4**: p. 25.
40. Kobayashi A., Shawlot W., Kania A., and Behringer R.R., *Requirement of Lim1 for female reproductive tract development*. Development, 2004. **131**(3): p. 539-49.
41. Ledig S., Brucker S., Barresi G., Schomburg J., Rall K., and Wieacker P., *Frame shift mutation of LHX1 is associated with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome*. Hum Reprod, 2012. **27**(9): p. 2872-5.
42. Gervasini C., Grati F.R., Lalatta F., Tabano S., Gentilin B., Colapietro P., De Toffol S., Frontino G., Motta F., Maitz S., Bernardini L., Dallapiccola B., Fedele L., Larizza L., and Miozzo M., *SHOX duplications found in some cases with type I Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 2010. **12**(10): p. 634-40.

43. Sandbacka M., Halttunen M., Jokimaa V., Aittomaki K., and Laivuori H., *Evaluation of SHOX copy number variations in patients with Mullerian aplasia*. Orphanet journal of rare diseases, 2011. **6**: p. 53.
44. Nik-Zainal S., Strick R., Storer M., Huang N., Rad R., Willatt L., Fitzgerald T., Martin V., Sandford R., Carter N.P., Janecke A.R., Renner S.P., Oppelt P.G., Oppelt P., Schulze C., Brucker S., Hurles M., Beckmann M.W., Strissel P.L., and Shaw-Smith C., *High incidence of recurrent copy number variants in patients with isolated and syndromic Mullerian aplasia*. Journal of medical genetics, 2011. **48**(3): p. 197-204.
45. Morcel K., Watrin T., Pasquier L., Rochard L., Le Caignec C., Dubourg C., Loget P., Panier B.J., Odent S., David V., Pellerin I., Bendavid C., and Guerrier D., *Utero-vaginal aplasia (Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome) associated with deletions in known DiGeorge or DiGeorge-like loci*. Orphanet journal of rare diseases, 2011. **6**: p. 9.
46. Stuppia L., Antonucci I., Palka G., and Gatta V., *Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(3): p. 3245-76.
47. Sandbacka M., Laivuori H., Freitas E., Halttunen M., Jokimaa V., Morin-Papunen L., Rosenberg C., and Aittomaki K., *TBX6, LHX1 and copy number variations in the complex genetics of Mullerian aplasia*. Orphanet J Rare Dis, 2013. **8**: p. 125.
48. White P.H., Farkas D.R., McFadden E.E., and Chapman D.L., *Defective somite patterning in mouse embryos with reduced levels of Tbx6*. Development, 2003. **130**(8): p. 1681-90.
49. Chen M.J., Wei S.Y., Yang W.S., Wu T.T., Li H.Y., Ho H.N., Yang Y.S., and Chen P.L., *Concurrent exome-targeted next-generation sequencing and single nucleotide polymorphism array to identify the causative genetic aberrations of isolated Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. Hum Reprod, 2015.
50. Rall K., Eisenbeis S., Barresi G., Ruckner D., Walter M., Poths S., Wallwiener D., Riess O., Bonin M., and Brucker S., *Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome discordance in monozygotic twins: matrix metalloproteinase 14, low-density lipoprotein receptor-related protein 10, extracellular matrix, and neoangiogenesis genes identified as candidate genes in a tissue-specific mosaicism*. Fertil Steril, 2014.

51. Pizzo A., Lagana A.S., Sturlese E., Retto G., Retto A., De Dominici R., and Puzzolo D., *Mayer-rokitansky-kuster-hauser syndrome: embryology, genetics and clinical and surgical treatment*. ISRN Obstet Gynecol, 2013. **2013**: p. 628717.
52. Ravel C., Lorenzo D., Dessolle L., Mandelbaum J., McElreavey K., Darai E., and Siffroi J.P., *Mutational analysis of the WNT gene family in women with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. Fertility and sterility, 2009. **91**(4 Suppl): p. 1604-7.
53. Cramer D.W., Goldstein D.P., Fraer C., and Reichardt J.K., *Vaginal agenesis (Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome) associated with the N314D mutation of galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT)*. Molecular human reproduction, 1996. **2**(3): p. 145-8.
54. Rubio-Gozalbo M.E., Gubbels C.S., Bakker J.A., Menheere P.P., Wodzig W.K., and Land J.A., *Gonadal function in male and female patients with classic galactosemia*. Human reproduction update, 2010. **16**(2): p. 177-88.
55. Vainio S., Heikkila M., Kispert A., Chin N., and McMahon A.P., *Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 405-9.
56. Wang M., Li Y., Ma W., Li H., He F., Pu D., Su T., and Wang S., *Analysis of WNT9B mutations in Chinese women with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. Reprod Biomed Online, 2014. **28**(1): p. 80-5.
57. Oppelt P., Strissel P.L., Kellermann A., Seeber S., Humeny A., Beckmann M.W., and Strick R., *DNA sequence variations of the entire anti-Mullerian hormone (AMH) gene promoter and AMH protein expression in patients with the Mayer-Rokitanski-Kuster-Hauser syndrome*. Hum Reprod, 2005. **20**(1): p. 149-57.
58. Resendes B.L., Sohn S.H., Stelling J.R., Tineo R., Davis A.J., Gray M.R., and Reindollar R.H., *Role for anti-Mullerian hormone in congenital absence of the uterus and vagina*. American journal of medical genetics, 2001. **98**(2): p. 129-36.
59. Drummond J.B., Rezende C.F., Peixoto F.C., Carvalho J.S., Reis F.M., and De Marco L., *Molecular analysis of the beta-catenin gene in patients with the Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. J Assist Reprod Genet, 2008. **25**(11-12): p. 511-4.

60. Timmreck L.S., Gray M.R., Handelin B., Allito B., Rohlfes E., Davis A.J., Gidwani G., and Reindollar R.H., *Analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in patients with congenital absence of the uterus and vagina*. American journal of medical genetics. Part A, 2003. **120A**(1): p. 72-6.
61. Demir D., Alper O., Erman Akar M., Simsek M., Ozkan O., Pehlivanoglu S., Luleci G., *Mutation Analysis of the CFTR Gene in Patients with Congenital Absence of Uterus and Vagina*. in *Uluslararası Katılımlı 9. Tıbbi Genetik Kongresi*. 2011. Istanbul, Türkiye: Clinical Genetics.
62. Jarzabek K., Zbucka M., Pepinski W., Szamatowicz J., Domitrz J., Janica J., Wolczynski S., and Szamatowicz M., *Cystic fibrosis as a cause of infertility*. Reprod Biol, 2004. **4**(2): p. 119-29.
63. Sandbacka M., Painter J., Puhakka M., Halttunen M., Laivuori H., and Aittomaki K., *Does the Y chromosome have a role in Mullerian aplasia?* Fertility and sterility, 2010. **94**(1): p. 120-5.
64. Abraham M.B., Carpenter K., Baynam G.S., Mackay D.J., Price G., and Choong C.S., *Report and review of described associations of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome and Silver-Russell syndrome*. J Paediatr Child Health, 2014.
65. Sandbacka M., Bruce S., Halttunen M., Puhakka M., Lahermo P., Hannula-Jouppi K., Lipsanen-Nyman M., Kere J., Aittomaki K., and Laivuori H., *Methylation of H19 and its imprinted control region (H19 ICR1) in Mullerian aplasia*. Fertility and sterility, 2011. **95**(8): p. 2703-6.
66. Passarge E., *Renkli Genetik Atlası*. 3. Baskı, ed. M.S. Güven Lüleci, Özgül Alper. 2009: Nobel Kitabevi.
67. Lalwani S., Wu H.H., Reindollar R.H., and Gray M.R., *HOXA10 mutations in congenital absence of uterus and vagina*. Fertility and sterility, 2008. **89**(2): p. 325-30.
68. Chen X., Li G., Qin Y., Cui Y., You L., and Chen Z.J., *Mutations in HOXA11 are not responsible for Mullerian duct anomalies in Chinese patients*. Reprod Biomed Online, 2014. **28**(6): p. 739-42.
69. Nodale C., Ceccarelli S., Giuliano M., Cammarota M., D'Amici S., Vescarelli E., Maffucci D., Bellati F., Panici P.B., Romano F., Angeloni A., and Marchese C., *Gene expression profile of patients with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: new insights into the potential role of developmental pathways*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91010.

70. Morcel K., Watrin T., Jaffre F., Deschamps S., Omilli F., Pellerin I., Leveque J., and Guerrier D., *Involvement of ITIH5, a candidate gene for congenital uterovaginal aplasia (Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome), in female genital tract development*. Gene Expr, 2012. **15**(5-6): p. 207-14.
71. Sund K.L., Zimmerman S.L., Thomas C., Mitchell A.L., Prada C.E., Grote L., Bao L., Martin L.J., and Smolarek T.A., *Regions of homozygosity identified by SNP microarray analysis aid in the diagnosis of autosomal recessive disease and incidentally detect parental blood relationships*. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 2013. **15**(1): p. 70-8.
72. Bennett R.L., Hart K.A., O'Rourke E., Barranger J.A., Johnson J., MacDermot K.D., Pastores G.M., Steiner R.D., and Thadhani R., *Fabry disease in genetic counseling practice: recommendations of the National Society of Genetic Counselors*. J Genet Couns, 2002. **11**(2): p. 121-46.
73. CHSY3 protein expression profile.
<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000198108-CHSY3/tissue>.
74. van Hengel J., Calore M., Baucé B., Dazzo E., Mazzotti E., De Bortoli M., Lorenzon A., Li Mura I.E., Beffagna G., Rigato I., Vleeschouwers M., Tyberghein K., Hulpiau P., van Hamme E., Zaglia T., Corrado D., Basso C., Thiene G., Daliento L., Nava A., van Roy F., and Rampazzo A., *Mutations in the area composita protein alphaT-catenin are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. Eur Heart J, 2013. **34**(3): p. 201-10.
75. Erman Akar M., Ozekinci M., Alper O., Demir D., Cevikol C., Meric Bilekdemir A., Daloglu A., Ongut G., Senol Y., Ozdem S., Uzun G., Luleci G., and Suleymanlar G., *Assessment of women who applied for the uterine transplant project as potential candidates for uterus transplantation*. J Obstet Gynaecol Res, 2015. **41**(1): p. 12-6.
76. Ozekinci M., Erman Akar M., Senol Y., Ozdem S., Uzun G., Daloglu A., and Ongut G., *Comparison of markers of ovarian reserve between patients with complete mullerian agenesis and age-matched fertile and infertile controls*. Fertil Steril, 2015. **104**(1): p. 176-9.
77. Her C., Zhao N., Wu X., and Tompkins J.D., *MutS homologues hMSH4 and hMSH5: diverse functional implications in humans*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 905-11.

78. Yu D.A., Yoon J., Ko Y.S., Park J., Kim S.Y., Kim M.A., Kim J.H., Jung J., Cheon Y., Lee H.S., Kim W.H., and Lee B.L., *Forkhead transcription factor FOXO1 inhibits nuclear factor-kappaB in gastric cancer*. APMIS, 2014. **122**(9): p. 848-55.
79. Ledig S., Schippert C., Strick R., Beckmann M.W., Oppelt P.G., and Wieacker P., *Recurrent aberrations identified by array-CGH in patients with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. Fertility and sterility, 2011. **95**(5): p. 1589-94.
80. Weiss L.A., Shen Y., Korn J.M., Arking D.E., Miller D.T., Fossdal R., Saemundsen E., Stefansson H., Ferreira M.A., Green T., Platt O.S., Ruderfer D.M., Walsh C.A., Altshuler D., Chakravarti A., Tanzi R.E., Stefansson K., Santangelo S.L., Gusella J.F., Sklar P., Wu B.L., and Daly M.J., *Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism*. The New England journal of medicine, 2008. **358**(7): p. 667-75.
81. Shinawi M., Liu P., Kang S.H., Shen J., Belmont J.W., Scott D.A., Probst F.J., Craigen W.J., Graham B.H., Pursley A., Clark G., Lee J., Proud M., Stocco A., Rodriguez D.L., Kozel B.A., Sparagana S., Roeder E.R., McGrew S.G., Kurczynski T.W., Allison L.J., Amato S., Savage S., Patel A., Stankiewicz P., Beaudet A.L., Cheung S.W., and Lupski J.R., *Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size*. Journal of medical genetics, 2010. **47**(5): p. 332-41.
82. Walters R.G., Jacquemont S., Valsesia A., de Smith A.J., Martinet D., Andersson J., Falchi M., Chen F., Andrieux J., Lobbens S., Delobel B., Stutzmann F., El-Sayed Moustafa J.S., Chevre J.C., Lecoecur C., Vatin V., Bouquillon S., Buxton J.L., Boute O., Holder-Espinasse M., Cuisset J.M., Lemaitre M.P., Ambresin A.E., Brioschi A., Gaillard M., Giusti V., Fellmann F., Ferrarini A., Hadjikhani N., Campion D., Guilmatre A., Goldenberg A., Calmels N., Mandel J.L., Le Caignec C., David A., Isidor B., Cordier M.P., Dupuis-Girod S., Labalme A., Sanlaville D., Beri-Dexheimer M., Jonveaux P., Leheup B., Ounap K., Bochukova E.G., Henning E., Keogh J., Ellis R.J., Macdermot K.D., van Haelst M.M., Vincent-Delorme C., Plessis G., Touraine R., Philippe A., Malan V., Mathieu-Dramard M., Chiesa J., Blaumeiser B., Kooy R.F., Caiazzo R., Pigeyre M., Balkau B., Sladek R., Bergmann S., Mooser V., Waterworth D., Reymond A., Vollenweider P., Waeber G., Kurg A., Palta P., Esko T., Metspalu A., Nelis M., Elliott P., Hartikainen A.L., McCarthy M.I., Peltonen L., Carlsson L., Jacobson P., Sjostrom L., Huang N., Hurles M.E., O'Rahilly S., Farooqi I.S., Mannik K., Jarvelin M.R., Pattou F., Meyre D., Walley A.J., Coin L.J., Blakemore A.I., Froguel P., and Beckmann J.S., *A new*

highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. Nature, 2010. **463**(7281): p. 671-5.

83. Boyden E.D., Campos-Xavier A.B., Kalamajski S., Cameron T.L., Suarez P., Tanackovic G., Andria G., Ballhausen D., Briggs M.D., Hartley C., Cohn D.H., Davidson H.R., Hall C., Ikegawa S., Jouk P.S., Konig R., Megarbane A., Nishimura G., Lachman R.S., Mortier G., Rimoin D.L., Rogers R.C., Rossi M., Sawada H., Scott R., Unger S., Valadares E.R., Bateman J.F., Warman M.L., Superti-Furga A., and Bonafe L., *Recurrent dominant mutations affecting two adjacent residues in the motor domain of the monomeric kinesin KIF22 result in skeletal dysplasia and joint laxity.* Am J Hum Genet, 2011. **89**(6): p. 767-72.
84. Moore T.M., Garg R., Johnson C., Coptcoat M.J., Ridley A.J., and Morris J.D., *PSK, a novel STE20-like kinase derived from prostatic carcinoma that activates the c-Jun N-terminal kinase mitogen-activated protein kinase pathway and regulates actin cytoskeletal organization.* J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 4311-22.
85. de Anda F.C., Rosario A.L., Durak O., Tran T., Graff J., Meletis K., Rei D., Soda T., Madabhushi R., Ginty D.D., Kolodkin A.L., and Tsai L.H., *Autism spectrum disorder susceptibility gene TAOX2 affects basal dendrite formation in the neocortex.* Nat Neurosci, 2012. **15**(7): p. 1022-31.
86. Bill B.R., Lowe J.K., Dybuncio C.T., and Fogel B.L., *Orchestration of neurodevelopmental programs by RBFOX1: implications for autism spectrum disorder.* Int Rev Neurobiol, 2013. **113**: p. 251-67.
87. Gehman L.T., Stoilov P., Maguire J., Damianov A., Lin C.H., Shiue L., Ares M., Jr., Mody I., and Black D.L., *The splicing regulator Rbfox1 (A2BP1) controls neuronal excitation in the mammalian brain.* Nat Genet, 2011. **43**(7): p. 706-11.
88. Chang X., Qin Y., Xu C., Li G., Zhao X., and Chen Z.J., *Mutations in WNT4 are not responsible for Mullerian duct abnormalities in Chinese women.* Reprod Biomed Online, 2012. **24**(6): p. 630-3.
89. Mauxion F., Preve B., and Seraphin B., *C2ORF29/CNOT11 and CNOT10 form a new module of the CCR4-NOT complex.* RNA Biol, 2013. **10**(2): p. 267-76.
90. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CNOT10&keywords=CNOT10>.

91. Chen Y.L., Yuan R.H., Yang W.C., Hsu H.C., and Jeng Y.M., *The stem cell E3-ligase Lin-41 promotes liver cancer progression through inhibition of microRNA-mediated gene silencing*. J Pathol, 2013. **229**(3): p. 486-96.
92. Mitschka S., Ulas T., Goller T., Schneider K., Egert A., Mertens J., Brustle O., Schorle H., Beyer M., Klee K., Xue J., Gunther P., Bassler K., Schultze J.L., and Kolanus W., *Co-existence of intact stemness and priming of neural differentiation programs in mES cells lacking Trim71*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 11126.
93. Chen X., Hamon M., Deng Z., Centola M., Sood R., Taylor K., Kastner D.L., and Fischel-Ghodsian N., *Identification and characterization of a zinc finger gene (ZNF213) from 16p13.3*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1444**(2): p. 218-30.
94. Yada T., Sato T., Kaseyama H., Gotoh M., Iwasaki H., Kikuchi N., Kwon Y.D., Togayachi A., Kudo T., Watanabe H., Narimatsu H., and Kimata K., *Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 39711-25.
95. Kalathas D., Theocharis D.A., Bounias D., Kyriakopoulou D., Papageorgakopoulou N., Stavropoulos M.S., and Vynios D.H., *Chondroitin synthases I, II, III and chondroitin sulfate glucuronyltransferase expression in colorectal cancer*. Mol Med Rep, 2011. **4**(2): p. 363-8.
96. Wang J., Yu J.T., Jiang T., Tan M.S., Wang H.F., Tan L., Hu N., Sun L., Zhang W., and Tan L., *Association of LRRTM3 polymorphisms with late-onset Alzheimer's disease in Han Chinese*. Exp Gerontol, 2014. **52**: p. 18-22.
97. Sousa I., Clark T.G., Holt R., Pagnamenta A.T., Mulder E.J., Minderaa R.B., Bailey A.J., Battaglia A., Klauck S.M., Poustka F., Monaco A.P., and International Molecular Genetic Study of Autism C., *Polymorphisms in leucine-rich repeat genes are associated with autism spectrum disorder susceptibility in populations of European ancestry*. Mol Autism, 2010. **1**(1): p. 7.
98. LRRTM3 protein expression profile.
<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000198739-LRRTM3/tissue>
99. Al Moustafa A.E., Yen L., Benlimame N., and Alaoui-Jamali M.A., *Regulation of E-cadherin/catenin complex patterns by epidermal growth factor receptor modulation in human lung cancer cells*. Lung Cancer, 2002. **37**(1): p. 49-56.

100. Miyashita A., Arai H., Asada T., Imagawa M., Matsubara E., Shoji M., Higuchi S., Urakami K., Kakita A., Takahashi H., Toyabe S., Akazawa K., Kanazawa I., Ihara Y., Kuwano R., and Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's D., *Genetic association of CTNNA3 with late-onset Alzheimer's disease in females*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(23): p. 2854-69.
101. Bacchelli E., Ceroni F., Pinto D., Lomartire S., Giannandrea M., D'Adamo P., Bonora E., Parchi P., Tancredi R., Battaglia A., and Maestrini E., *A CTNNA3 compound heterozygous deletion implicates a role for alphaT-catenin in susceptibility to autism spectrum disorder*. J Neurodev Disord, 2014. **6**(1): p. 17.
102. Seo S., Takayama K., Uno K., Ohi K., Hashimoto R., Nishizawa D., Ikeda K., Ozaki N., Nabeshima T., Miyamoto Y., and Nitta A., *Functional analysis of deep intronic SNP rs13438494 in intron 24 of PCLO gene*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76960.
103. CTNNA3 protein expression profile.
<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000183230-CTNNA3/tissue>.
104. Lindner T.H., Njolstad P.R., Horikawa Y., Bostad L., Bell G.I., and Sovik O., *A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta*. Human molecular genetics, 1999. **8**(11): p. 2001-8.
105. Haumaitre C., Fabre M., Cormier S., Baumann C., Delezoide A.L., and Cereghini S., *Severe pancreas hypoplasia and multicystic renal dysplasia in two human fetuses carrying novel HNF1beta/MODY5 mutations*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(15): p. 2363-75.
106. Coffinier C., Thepot D., Babinet C., Yaniv M., and Barra J., *Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation*. Development, 1999. **126**(21): p. 4785-94.
107. Kim H.G., Ahn J.W., Kurth I., Ullmann R., Kim H.T., Kulharya A., Ha K.S., Itokawa Y., Meliciani I., Wenzel W., Lee D., Rosenberger G., Ozata M., Bick D.P., Sherins R.J., Nagase T., Tekin M., Kim S.H., Kim C.H., Ropers H.H., Gusella J.F., Kalscheuer V., Choi C.Y., and Layman L.C., *WDR11, a WD protein that interacts with transcription factor EMX1, is mutated in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome*. American journal of human genetics, 2010. **87**(4): p. 465-79.
108. Alper O.M., Erengin H., Manguoglu A.E., Bilgen T., Cetin Z., Dedeoglu N., and Luleci G., *Consanguineous marriages in the province of Antalya, Turkey*. Ann Genet, 2004. **47**(2): p. 129-38.

EKLER

Hasta Klinik Değerlendirme Formu

MA gen haritalama araştırma projesi

Tarih:

Dosya No:

Adı – Soyadı:

Doğum Tarihi:

Doğum Yeri/Ailesel Kökeni:

Medeni Hali:

Klinik Tanı:

Konjenital Vajinal Agenezis: Var ☐ Yok ☐

Rudimenter Uterus: Var ☐ Yok ☐

Complete Mülleryan Agenezis: Var ☐ Yok ☐

Primer Amonere: Var ☐ Yok ☐

Over Anomalileri: Var ☐ Yok ☐

Diğer KHD Muayene Bulguları:

İskelet Anomalileri: Var ☐ Yok ☐

Böbrek Anomalileri: Var ☐ Yok ☐

Diğer Anomali ve Hastalıklar:

Anne-Baba Akraba Evliliği: Var ☐ Yok ☐

Aile Bireylerinde Benzer Öykü:

Biyokimyasal Test Sonuçları

FSH:

LH:

E2:

PRL:

TSH:

Progesteron:

Adres:

Tel:

Hikayeyi Alan:

ÖZGEÇMİŞ

03.03.1984 tarihinde, Antalya’da doğan, Durkadin DEMİR EKŞİ, ilkokul eğitimini 1990-1995 yılları arasında Duraliler İlkokulu’nda, ortaöğretim ve lise eğitimini 1995-2002 yılları arasında Antalya Hacı Malike Mehmet Bileydi Anadolu Lisesi’nde gerçekleştirmiştir. 2006 yılında, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü’nden mezun olmuştur. 2006-2009 yılları arasında, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Yüksek Lisans Programı’nda yüksek lisans eğitimini tamamlamıştır. 2009 yılında aynı bölüm Tıbbi Genetik Programı’na kayıtlı olarak doktora eğitimine başlamış, halen Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.