

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**POLİKİSTİK OVER SENDROMLU ERGEN KIZLARDA
İLİŞKİLİ OLABİLECEK POLİMORFİZMLERİN MOLEKÜLER
TANI YÖNTEMLERİ İLE SAPTANMASI**

DOKTORA TEZİ

Uzm. Bio. TUĞBA ÜNSAL

Tez Danışmanı
Prof. Dr. ADNAN MENEVŞE

ANKARA
Eylül 2007

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**POLİKİSTİK OVER SENDROMLU ERGEN KIZLARDA
İLİŞKİLİ OLABİLECEK POLİMORFİZMLERİN MOLEKÜLER
TANI YÖNTEMLERİ İLE SAPTANMASI**

DOKTORA TEZİ

Uzm. Bio. TUĞBA ÜNSAL

Tez Danışmanı
Prof. Dr. ADNAN MENEVŞE

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE-01/2006-05 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Eylül 2007

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 28/9/2007

**Prof. Dr. Adnan MENEVŞE
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**

**Prof. Dr. Sevdâ MENEVŞE
Gazi Üniversitesi**

**Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ
Gazi Üniversitesi**

**Prof. Dr. Aysun BİDECİ
Gazi Üniversitesi**

**Prof. Dr. Ahmet Çolak
Cumhuriyet Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller, Resimler ve Grafikler	V
Tablolar	VII
Simge ve Kısaltmalar	IX
Önsöz	XI
1. Giriş	1
2. Genel Bilgiler	2
2.1. Polikistik Over Sendromu	2
2.1.1. PKOS'un Tarihçesi	2
2.1.2. PKOS'un Tipleri	3
2.1.3. PKOS'ta Klinik Bulgular	4
2.1.4. PKOS'ta Tanı Kriterleri	5
2.1.5. PKOS'lu Olgularda Uzun Dönem Hastalık Riskleri	6
2.1.6. PKOS'un Etiyolojisi	6
2.1.7. PKOS'ta Glikoz Toleransı ve İnsülin Direnci	7
2.1.8. PKOS'ta Genetik Nedenler	10
2.2. PKOS'un Genetik Temelleri	10
2.2.1. PKOS'ta Aday Genler	12
2.3. Calpain 10 Geni	14
2.4. İnsülin Reseptör Geni	15
2.5. Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 Geni	17
3. Gereç ve Yöntem	19
3.1. Araç ve Gereçler	19
3.1.1. Cihazlar	19
3.1.2. Kimyasal Maddeler	19
3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı	20
3.2.1. 5X TBE Çözeltisi Hazırlanışı	20
3.2.2. 1X TBE Çözeltisi Hazırlanışı	20
3.2.3. Orange G Jel Yükleme Boyası Hazırlanışı	20
3.2.4. Stok Etidyum Bromür Çözeltisi Hazırlanışı	20
3.2.5. 3X Sodyum asetat (NaOAc) Çözeltisi Hazırlanışı	20
3.3. Agaroz Jel Hazırlanışı	21
3.4. Yöntemler	21
3.4.1. Çalışma Grubu ve Klinik Özellikler	21
3.4.2. Genomik DNA Saflaştırılması	22
3.4.3. Calpain 10 Geni -44 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR İle Çoğaltılması	22
3.4.4. Calpain 10 Geni -43 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR İle Çoğaltılması	23
3.4.5. Calpain 10 Geni -19 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR İle Çoğaltılması	24
3.4.6. Calpain 10 Geni -63 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR İle Çoğaltılması	24

3.4.7. Calpain 10 Geni -44, -43, -19, -63 Polimorfizmlerini İçeren Bölgelerin PCR Tepkime Karışımı	25
3.4.8. Calpain 10 Geni -44, -43, -19, -63 Polimorfizmlerini İçeren Bölgelerin PCR Programı	26
3.4.9. Calpain 10 Geni -44, -43, -19, -63 Polimorfizmlerini İçeren Bölgelere Ait PCR Ürünlerinin Analizi	27
3.4.10. Calpain 10 Geni -44, -43, -19, -63 Polimorfizmlerini İçeren Bölgelere Ait PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri İle Kesimi	27
3.4.11. Calpain 10 Geni -44 Polimorfizmini İçeren Bölgenin BstFN I Restriksiyon Enzimi İle Kesimi	27
3.4.11.1. Deneyin Yapılışı	28
3.4.12. Calpain 10 Geni -43 Polimorfizmini İçeren Bölgenin FauND I Restriksiyon Enzimi İle Kesimi	28
3.4.12.1. Deneyin Yapılışı	28
3.4.13. Calpain 10 Geni -63 Polimorfizmini İçeren Bölgenin Hha I Restriksiyon Enzimi İle Kesimi	29
3.4.13.1. Deneyin Yapılışı	29
3.4.14. İnsülin Reseptör Geni Ekson 17 C/T Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR İle Çoğaltılması	29
3.4.14.1. İnsülin Reseptör Geni Ekson 17 C/T Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR Karışımı	30
3.4.14.2. İnsülin Reseptör Geni Ekson 17 C/T Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR Programı	31
3.4.14.3. İnsülin Reseptör Geni Ekson 17 C/T Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR Ürününün Analizi	31
3.4.15. İnsülin Reseptör Geni Ekson 17 C/T Polimorfizmini İçeren Bölgenin Restriksiyon Enzimi İle Kesimi	32
3.4.15.1. İnsülin Reseptör Geni Ekson 17 C/T Polimorfizmini İçeren Bölgenin Pml I Restriksiyon Enzimi İle Kesimi	32
3.4.15.2. Deneyin Yapılışı	32
3.4.16. Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 Geni Promotor Bölge 4G5G Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR İle Çoğaltılması	33
3.4.16.1. Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 Geni Promotor Bölge 4G5G Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR Karışımı	33
3.4.16.2. Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 Geni Promotor Bölge 4G5G Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR Programı	34
3.4.16.3. Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 Geni Promotor Bölge 4G5G Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR Ürününün Analizi	35
3.4.17. Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 Geni Promotor Bölge 4G5G Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR Ürününün Restriksiyon Enzimi İle Kesimi	35
3.4.17.1. Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 Geni Promotor Bölge 4G5G Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR Ürününün Bsl I Restriksiyon Enzimi İle Kesimi	35

3.4.17.2. Deneyin Yapılışı	36
3.4.18. Döngüsel DNA Dizi Analizi Yöntemi ile İnsülin Reseptör (INSR) Geni Ekzon 12 Polimorfizmlerinin Gösterilmesi	36
3.4.18.1. DNA Dizi Analizi Yapılacak Bölgenin PCR Yöntemi İle Çoğaltılması	36
3.4.18.2. DNA Dizi Analizi Yapılacak Bölgenin PCR Ürününün Saflaştırılması	37
3.4.18.3. Saflaştırılan PCR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Analizi	37
3.4.18.4. Döngüsel DNA Dizi Analizi Tepkime Karışımı	38
3.5. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	39
4. Bulgular	40
4.1. Klinik Bulgular	40
4.2. Moleküler Genetik Analiz Bulguları	41
4.2.1. Calpain 10 Geni SNP 44 Bölgesi PCR ve Enzim Kesim Sonuçları	41
4.2.2. Calpain 10 Geni SNP 43 Bölgesi PCR ve Enzim Kesim Sonuçları	43
4.2.3. Calpain 10 Geni SNP 19 Bölgesi PCR Sonuçları	46
4.2.4. Calpain 10 Geni SNP 43 Bölgesi PCR ve Enzim Kesim Sonuçları	47
4.2.5. İnsülin Reseptör Geni Ekson 17 C/T Polimorfizm Bölgesi PCR ve Enzim Kesim Sonuçları	51
4.2.6. PAI 1 Geni Promotor Bölge 4G5G Polimorfizm Bölgesi PCR ve Enzim Kesim Sonuçları	53
4.2.7. Döngüsel DNA Dizi Analizi Sonuçları	56
5. Tartışma	60
6. Sonuç	67
7. Özet	68
8. Summary	70
9. Kaynaklar	72
10. Özgeçmiş	80

ŞEKİLLER, RESİMLER VE GRAFİKLER

Sayfa No.

Şekil 1: PKOS ile ilişkili bulguların yaşa bağlı ortaya çıkış zamanları	6
Şekil 2: PKOS'ta etiyolojik faktörler	7
Şekil 3: İnsülin reseptörünün hücre zarında yerleşimi	9
Şekil 4: Calpain 10 geninin yapısı	15
Şekil 5: İnsülin Reseptör geninin yapısı	16
Şekil 6: PAI 1 geninin yapısı	18
Şekil 7: Calpain 10 geni SNP -44 polimorfizmine ait 166 bç'lik bölgenin genomdaki yerleşimi	23
Şekil 8: Calpain 10 geni SNP -43 polimorfizmine ait 175 bç'lik bölgenin genomdaki yerleşimi	23
Şekil 9: Calpain 10 geni SNP -19 polimorfizmine ait bölgenin genomdaki yerleşimi	24
Şekil 10: Calpain 10 geni SNP -63 polimorfizmine ait 192 bç'lik bölgenin genomdaki yerleşimi	25
Şekil 11: INSR geni ekson 17 C/T polimorfizmine ait 317 bç'lik bölgenin genomdaki yerleşimi	30
Şekil 12: PAI-1 Geni Promotor 4G/5G polimorfizmine ait 99 bç'lik bölgenin genomdaki yerleşimi	33
Şekil 13: Calpain 10 SNP -44 bölgesi PCR sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	41
Şekil 14: <i>Bst</i> FNI enzimle kesim sonuçlarının % 3'lük agaroz jeldeki görüntüsü	42
Şekil 15: Calpain 10 SNP -43 bölgesi PCR sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	44
Şekil 16: <i>Fau</i> NDI enzimle kesim sonuçlarının % 3'lük agaroz jeldeki görüntüsü	44
Şekil 17: Calpain 10 SNP -19 bölgesi PCR sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	46
Şekil 18: Calpain 10 SNP -63 bölgesi PCR sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	48
Şekil 19: <i>Hha</i> I enzimle kesim sonuçlarının % 3'lük agaroz jeldeki görüntüsü	48
Şekil 20: INSR Geni Ekson 17 C/T 317 bç'lik tekrar bölgesi PCR sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	51
Şekil 21: <i>Pml</i> I enzimle kesim sonuçlarının % 3'lük agaroz jeldeki görüntüsü	52
Şekil 22: PAI 1 geni promotor 4G/5G 99 bç'lik bölgenin PCR sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	54
Şekil 23: <i>Bsl</i> I enzimle kesim sonuçlarının % 3'lük agaroz jeldeki görüntüsü	54
Şekil 24: İnsülin reseptör geni ekson 12 ve ardındaki intron	

bölgesindeki rs16994210 C>T (CC), rs35045353 C>T (CC),
rs2229434 G>A (GA), rs2162771 C>T (CC), rs1541806 C>T
(CC), rs2229430 G>C (GC) ve rs13306451 A>G (AA)
genotipli bireye ait DNA dizi analizi görüntüsü 57

Şekil 25: İnsülin reseptör geni ekson 12 ve ardındaki intron
bölgesindeki rs16994210 C>T (CC), rs35045353 C>T (CC),
rs2229434 G>A (GG), rs2162771 C>T (CC), rs1541806
C>T (CC), rs2229430 G>C (GG) ve rs13306451 A>G (AA)
genotipli bireye ait DNA dizi analizi görüntüsü 58

TABLÖLAR

Sayfa No.

Tablo 1: PKOS'ta aday genler	13
Tablo 2: Çalışma kapsamına alınan bireylere ait bilgi formu	22
Tablo 3: Calpain 10 geni SNP -44, -43, -19, -63 polimorfizmlerini içeren bölgelerin PCR tepkimesinde kullanılan primerler	25
Tablo 4: Calpain 10 geni SNP -44, -43, -19, -63 polimorfizmlerini içeren bölgelerin PCR karışımı	26
Tablo 5: Calpain 10 geni SNP -44, -43, -19, -63 polimorfizmlerini içeren bölgelerin PCR programı	26
Tablo 6: Calpain 10 geni SNP -44, -43 ve -63 polimorfizmlerini içeren bölgelerin enzim kesiminde kullanılan enzimler ve bu enzimlere ait bilgiler	27
Tablo 7: İnsülin reseptör geni ekson 17 C/T polimorfizmini içeren bölgelerin PCR tepkimesinde kullanılan primerler	30
Tablo 8: İnsülin reseptör geni ekson 17 polimorfizmini içeren bölgenin PCR tepkime karışımı	31
Tablo 9: İnsülin reseptör geni ekson 17 polimorfizmini içeren bölgenin PCR programı	31
Tablo 10: İnsülin reseptör geni ekson 17 C/T polimorfizmini içeren bölgenin enzim kesiminde kullanılan enzim ve bu enzime ait bilgiler	32
Tablo 11: PAI-1 geni promotor polimorfizmini içeren bölgelerin PCR tepkimesinde kullanılan primerler	33
Tablo 12: PAI-1 geni promotor 4G/5G polimorfizmini içeren bölgenin PCR tepkime karışımı	34
Tablo 13: PAI-1 geni promotor 4G/5G polimorfizmini içeren bölgenin PCR programı	34
Tablo 14: PAI-1 geni promotor 4G/5G polimorfizmini içeren bölgenin enzim kesiminde kullanılan enzim ve bu enzime ait bilgiler	35
Tablo 15: Dizi analizinde kullanılan PCR tepkime karışımı	36
Tablo 16: Dizi analizinde kullanılan PCR programı	37
Tablo 17: Dizi analizi amplifikasyon karışımı	38
Tablo 18: PKOS hastalarına ait bulgular ve kontrol grubunun bilgileri	40
Tablo 19: Calpain 10 SNP -44 bölgesi T/C değişiminin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel dağılımları	43
Tablo 20: Calpain 10 SNP -43 bölgesi G/A değişiminin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel dağılımları	45
Tablo 21: Calpain 10 SNP -19 bölgesi 32 bp'lik ins/del değişiminin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel dağılımları	47

Tablo 22: Calpain 10 SNP -63 bölgesi C/T değişiminin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel dağılımları	49
Tablo 23: Calpain 10 geninde yer alan SNP -44, SNP -43, SNP -19 ve SNP -63 için haplotiplerin hasta ve kontrol grubundaki dağılımı	50
Tablo 24: İnsülin reseptör geni ekson 17 bölgesi C/T değişiminin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel dağılımları	53
Tablo 25: PAI 1 geni promotor bölgesi 4G/5G değişiminin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel dağılımları	55
Tablo 26: İnsülin reseptör geni ekson 12 DNA dizi analizi genotip ve alel dağılımları	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
A	: Adenin
ACTH	: Adrenokortikotrop hormon
bç	: Baz çifti
C	: Sitozin
CAPN	: Calpain
DHEAS	: Dehidroepiandrosteron sülfat
dH ₂ O	: Distile su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetraasetikasit
FAH	: Fonksiyonel adrenal hiperandrojenemi
FOH	: Fonksiyonel over hiperandrojenemi
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
G	: Guanin
g	: Gram
IGF I	: İnsülin büyüme faktörü 1
INSR	: İnsülin reseptör
IRS	: İnsülin reseptör substratı
kb	: Kilobaz
kbç	: Kilobaz çifti
kD	: Kilodalton
LH	: Luteinize hormon
M	: Molar
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Elçi RNA
NIH	: National Institute of Health
PAI	: Plazminojen Aktivatör İnhibitörü
PCR	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
PKO	: Polikistik over
PKOS	: Polikistik over sendromu
RPM	: Dakika başına dönme sayısı
sn	: Saniye
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
T	: Timin
Taq	: Thermus aquaticus
TBE	: Tris-Borat EDTA tamponu
TNF α	: Tümör nekroz faktör alfa

Tris bazı	: Tris (hidroksimetil) amin
UV	: Ultraviole (mor ötesi)
V	: Volt
VKİ	: Vücut kitle indeksi
VNTR	: Değişik sayıda ardışık tekrar

ÖNSÖZ

“Polikistik Over Sendromlu Ergen Kızlarda İlişkili Olabilecek Polimorfizmlerin Moleküler Tanı Yöntemleri İle Saptanması” konulu bu tez, Gazi Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı’nca 01/2006-05 Kod No.lu proje ile desteklenmiş ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, 12.12.2005 tarih ve 305 No.lu üniversitemiz yerel etik kurul onayını almıştır.

Doktora öğrenimim süresince bilgisini ve deneyimini esirgemeyen, araştırmacı yönü ile bana her zaman yol gösteren, danışmanım, saygıdeğer hocam Prof.Dr. Adnan MENEVŞE’ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Değerli hocam Prof.Dr. Sevdâ MENEVŞE’ye doktora öğrenimim süresince göstermiş olduğu hoşgörü, iyi niyet ve katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Değerli hocam Prof.Dr. Abdullah EKMEKÇİ’ye doktora öğrenimim süresince göstermiş olduğu hoşgörü, iyi niyet ve katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince bana destek olan ve tezimin her aşamasında içten yardımlarını esirgemeyen Araş.Gör. Akın YILMAZ’a teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum başta H.İlke ÖNEN olmak üzere tüm değerli bölüm arkadaşlarıma, yardımları ve paylaşımları için teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleşmesindeki katkılarından dolayı değerli hocam Prof. Dr. Peyami Cinaz’a, her türlü desteğini ve katkılarını esirgemeyen değerli hocam Prof.Dr. Aysun BİDECİ’ye, Uzm.Dr. Ediz YEŞİLKAYA’ya ve Bio.Elif TAÇ AYVALI’ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca sevgi ve desteğini her zaman hissettiğim babam Mehmet ÜNSAL’a, göstermiş olduğu sabır ve desteği için kardeşim Ahu ÜNSAL’a ve her zaman yanımda olan, bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan annem İmran ÜNSAL’a hoşgörü, destek ve sabrı için en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamıma girdiği ilk günden beri büyük bir özveri ve sabır ile her zaman bana destek olan, inanan hayat arkadaşım, sevgili eşim Saim ÜYE’ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS), doğurganlık çağındaki kadınlarda en yaygın endokrin bozukluklardan biridir¹. PKOS'lu hastalarda hiperandrojenemi ve kronik anovulasyon anahtar rolü olan bulgulardır. İnsülin direnci ve obezite ile de sıklıkla karşılaşmaktadır^{2,3}.

Sıklığı doğurganlık çağındaki kadınlarda % 5-10, ergenlik dönemindeki kızlarda % 3 olarak bildirilmektedir⁴.

PKOS, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıkan ve bireysel farklılıklardan dolayı heterojen görünüm sergileyen ailesel kompleks bir hastalıktır. Genetik temeli ve kalıtım şekli henüz aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, sendromun gelişiminde farklı metabolik yollarda aday olduğu düşünülen genlerdeki polimorfizmler çalışılarak genetik temeli araştırılmaktadır^{5,6}. Bu amaçla steroid üretimi ve etki mekanizmalarında ifadelenen genler, gonadotropin salınımı ve düzenlenmesinde rolü olan genler, insülin salınımında görevli olan genler ve enerji metabolizmasında rolü olan genlerdeki polimorfizmler çalışılmaktadır⁷.

Bu tez çalışmasında, PKOS'lu ergen kızlarda Calpain 10 geni SNP -44, -43, -19 ve -63, insülin reseptör geni 17. eksonda C/T ve plazminojen aktivatör inhibitör 1 geni promotor bölgesinde 4G/5G polimorfizmleri çalışılarak toplumumuzdaki sıklığın araştırılması ve sendromla genetik ilişkilerinin gösterilerek genetik yatkınlığın belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, insülin reseptör geni 12. eksonu DNA dizi analizi yapılarak başka polimorfizmlerin varlığı da araştırılmıştır. Bu çalışma, PKOS'lu ergen kızlarda, sendromun genetik temeline yönelik olarak toplumumuzda yapılan ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 POLİKİSTİK OVER SENDROMU

Polikistik over sendromu (PKOS), değişik derecelerde adet düzensizliği, hirsutismus (kılınma), akne ve obezite ile seyreden, ilk belirtileri erken ergenlik çağında ortaya çıkan bir sendromdur^{8,9,10}.

Sıklığı doğurganlık çağındaki kadınlarda % 5-10, ergenlik dönemindeki kızlarda % 3 olarak bildirilmektedir⁴.

Ergenlik dönemindeki kızlarda kılınma artışı, akne, adet düzensizliği, obezite, cildin yağlanması artma, erkek tipi saç dökülmesi varlığında PKOS'tan şüphe edilmelidir. Sendromun seyri son derece değişken olup bazen başlangıçta bu bulgulardan sadece bir ya da ikisinin varlığı söz konusu olabilmektedir^{8,13,14}. Erişkin kadınlarda endokrin kökenli infertilitenin en sık nedeni olup, endometrium kanseri, tip 2 diyabet, hipertansiyon, aterosklerotik kalp ve damar hastalıkları için risk faktörüdür. PKOS'lu olgularda obezite, insülin direnci, hiperleptinemi ve dislipidemi gibi risk faktörlerinin varlığı kalp ve damar hastalıklarına eğilimin arttığını düşündürmektedir¹¹.

2.1.1 PKOS'un Tarihçesi

1844 yılında Chereau, ilk olarak yumurtalıklarda sklerokistik değişimler tanımlamıştır. 1935 yılında ise Stein ve Leventhal, menstruel düzensizlik bulgusu amenore, infertilite öyküsü, kılınma ve obezite içeren klinik bulgularla bilateral polikistik overleri tanımlamışlar ve uzun bir süre sendrom Stein-Leventhal sendromu olarak anılmıştır¹².

1958 yılında McArthur ve arkadaşları, polikistik overli kadınlarda yüksek luteinize hormon (LH) düzeyleri gözlemişler ve 1971 yılında radyoimmunoassay (RIA) tekniğinin kullanıma girmesiyle biyokimyasal tanı gündeme gelmiştir. 1976 yılında Kahn ve arkadaşları ve 1980 yılında Burghen ve arkadaşları, insülin direnci ve polikistik over sendromu arasında ilişki kurarak kilometre taşı oluşturmuşlardır. Polikistik overlerin ultrasonografik bulgusu, 1981 yılında Swanson ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. 1985 yılında ise Adams ve arkadaşları, polikistik overlerin ultrasonografik varlığının tanı kriteri olabileceğini açıklamışlardır¹².

2.1.2 PKOS'un Tipleri

- Klasik PKOS

Klasik PKOS, ilk defa 1935 yılında Stein-Leventhal tarafından tanımlanan amenore, polikistik görünümlü overler, hirsutismus ve obeziteyi içeren klasik formdur¹². Sendromla ilgili çalışmalar ve hasta sayısı arttıkça hastaların sadece % 50'sinin sendromun tanımlanan bütün özelliklerini taşıdığı anlaşılmıştır. Klasik PKOS'lu kadınların yaklaşık % 65'inde hirsutismus, % 65'inde anovulatuvar semptomlar, % 50'sinde obezite mevcuttur^{13,14}. Klasik PKOS'un laboratuvar bulguları arasında hiperandrojenemiye eşlik eden ultrasonografik olarak tespit edilmiş polikistik over görünümü ve artmış LH / FSH (folikül uyarıcı hormon) oranı vardır. Ancak, günümüzde bu bulguların her ikisi de tanı için gerekli görülen laboratuvar verileri olarak kabul görmemektedir^{8,13,15}.

- Atipik PKOS

Atipik PKOS, ultrasonografik anormallikler olmaksızın, başka sebeplerle açıklanamayan kronik androjen artışı olan bireyler için kullanılmaktadır. Ergenlik çağında ve erişkin dönemde klinik ve laboratuvar verilerinde izlenen heterojenite nedeniyle hastaların yaklaşık yarısı bu gruba girmektedir⁸.

PKOS'taki androjen artışının kaynağı, çoğunlukla fonksiyonel over hiperandrojenemisi (FOH), az sıklıkla ise fonksiyonel adrenal hiperandrojenemidir^{8,13}.

-Fonksiyonel over hiperandrojenemi (FOH)

FOH, PKOS'lu olgularda % 80 saptanan gonadotropin hormon bağımlı aşırı androjen üretimidir. Overlerde androjen üretiminde bozukluk söz konusu olup, gonadotropin uyarımına aşırı şekilde steroidogenik yanıt vardır. Normalde overlerde androjen üretimi ağırlıklı olarak LH uyarımı ile korpus luteumda yapılır. Daha sonra FSH etkisi ile androjenler östrojene dönüşür. Fakat, FOH'li olgularda gonadotropinlere verilen aşırı yanıt sonucu LH etkisiyle intraovaryan androjen yoğunluğu artar. Özellikle testosteronda gözlenen artış sonucu küçük foliküller büyür ve tek bir folikülün dominant folikül haline gelmesi engellenir^{16,17,18,26}.

-Fonksiyonel adrenal hiperandrojenemi (FAH)

FAH, PKOS'lu hastaların %25'inde saptanan glukokortikoidler tarafından baskılanabilen adrenokortikotropik hormona (ACTH) bağımlı 17 ketosteroid artışıdır^{8,18}.

FAH ve FOH olgularının birbirleri ile etkileşimi over ve adrenal bezde benzer steroidogenik üretim aşamalarının yer almasından kaynaklanır. Özellikle p450c 17 α enzim aktivitesinin hem over hem de adrenallerde mevcut olması buna örnek teşkil etmektedir^{8,13,18}.

2.1.3 PKOS'ta Klinik Bulgular

- Hirsutismus (Kıllanma)

Hirsutismus, androjenlere duyarlı bölgelerde koyu renkli terminal kılların çoğalması olup, erkeksi tipte kıllanma artışı olarak tanımlanmaktadır¹⁹. Yüz, boyun, gövde, ekstremiteler, pubik ve aksiller bölgede kılların büyümesi androjenlere bağımlıdır. Terminal kılların çoğalması sadece androjenlerin fazlalığına değil aynı zamanda kişiden kişiye değişen reseptör duyarlılığına da bağlıdır¹⁹. Bu nedenle PKOS'lu kadınlarda hirsutismus değişik derecelerde ortaya çıkabilmektedir⁸. Hirsutismusun derecelendirilmesi Ferriman-Gallwey skorlamasına göre yapılır. Sağlıklı kadınlarda, normalde sekiz puanın altında olması gereklidir²⁰.

Kıllanma artışına akne vulgaris, androjenik tipte saç dökülmesi, yağlanma, aşırı terleme gibi hirsutismus eşdeğeri bulgular eşlik edebilmektedir. PKOS'lu kızlarda akne vulgaris, olguların yaklaşık % 21'inde görülür ve tedaviye dirençlidir^{4,13,14}.

Hirsutismus ve hirsutismus eşdeğeri bulgular hiperandrojenemik kızlarda değişik oranlarda kendini gösterir ve olguların yaklaşık üçte ikisinde mevcuttur. Ayrıca bazı hirsutisimli olgularda hiperandrojenemi gösterilememekte, bu durum idiyopatik (nedeni belirlenemeyen) hirsutismus olarak adlandırılmaktadır^{8,21}.

- Overlerde fonksiyon bozukluğu

PKOS'lu olguların üçte ikisinde anovulatuvar semptomlar mevcuttur. Bu semptomlar, primer ve sekonder amenoreden oligomenoreye veya tam tersi aşırı ve sık kanama periyotlarına kadar değişen spektrumda olabilir^{13,14,18}. İki menstruel siklus arasında 35 günden fazla aralık olması oligomenore, 6 aydan daha uzun sürede hiç menstrüel kanama olmaması amenore olarak tanımlanmaktadır. Genellikle ergenlikten sonraki ilk iki yılda hipotalamus, hipofiz bezi ve ovaryan aksın olgunlaşmasına paralel olarak fizyolojik kabul edilen ve bu dönemdeki kızların yaklaşık yarısında izlenen anovulator periyotlar PKOS tanısında gecikmeye neden olabilir. Bu dönemde düzensiz adet siklusları olan genç kızlarda düzenli adet gören kızlara göre plazma androjenleri daha yüksek bulunmuştur. Kronik anovulasyon, endometrial hiperplazi ve karsinom açısından risk oluşturmaktadır^{8,11}.

- Obezite

Klasik PKOS'un en önemli bileşenlerinden birisidir ve PKOS'lu olgularda % 38-88 sıklıkla görülmektedir²³. Obezite, homeostatik proteinlerdeki değişimlerle ilişkilidir. Karın bölgesinde cilt altında, karın içi organların çevresinde yağlanma artışı dikkati çeker. Bu nedenle bel kalça oranındaki artış belirgindir. Gövdesel yağ birikimindeki artışta hiperandrojeneminin etkili olduğu ve abdominal obezitenin insülin direnci ile korelasyon gösterdiği belirtilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar bu tür bir yağ dağılımının vücut ağırlığından bağımsız olarak insülin direnci, hiperlipidemi, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalık açısından risk oluşturduğunu ortaya koymuştur^{22,23}.

2.1.4 PKOS'ta Tanı Kriterleri

PKOS tanısı klinik muayene ve laboratuvar bulguları birlikte değerlendirilerek konulur. PKOS hiperandrojenemik bir durum olduğundan öncelikle serum total testosteron, serbest testosteron ve DHEAS düzeyleri değerlendirilmelidir²⁴.

Hiperandrojenemik ergen kızlarda PKOS tanısı için PKOS'u taklit eden virilizan tümörler, hiperprolaktinemi, nonklasik konjenital adrenal hiperplazi ve Cushing sendromu dışlanmalıdır²⁴.

Klinik görünümün heterojen olması ve başka endokrin sorunlarla benzerliği nedeniyle PKOS tanısı konulabilmesi için pek çok toplantı yapılmıştır. Bunlardan en çok bilinenler 1990 yılında yapılan National Institute of Health (NIH)²⁴ toplantısıdır. Bu toplantıya göre araştırmacıların tanı kriterleri :

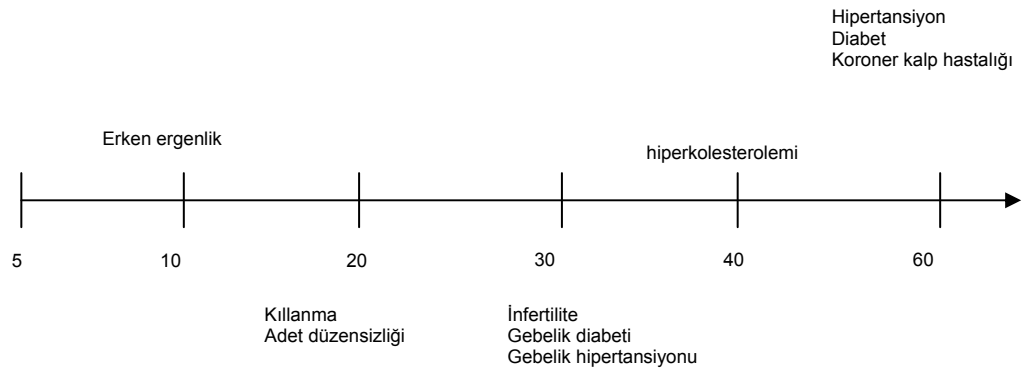
- ovulasyon bozukluğu
- hiperandrojenizm varlığı
- hiperprolaktinemi, tiroid fonksiyon bozuklukları, nonklasik adrenal hiperplazinin dışlanması olarak bildirilmiştir.

Toplantılardan sonuncusu ise 2003 yılında Rotterdam'da yapılmıştır²⁴. Bu toplantıya göre ise tanı kriterleri:

- oligo/an ovulasyon
- hiperandrojenizmin klinik ve biyokimyasal işaretleri
- PKOS'u taklit eden ilişkili hastalıkların dışlanması ve ultrasonografide polikistik over varlığının gösterilmesi olarak kabul edilmiştir.

2.1.5 PKOS'lu Olgularda Uzun Dönem Hastalık Riskleri

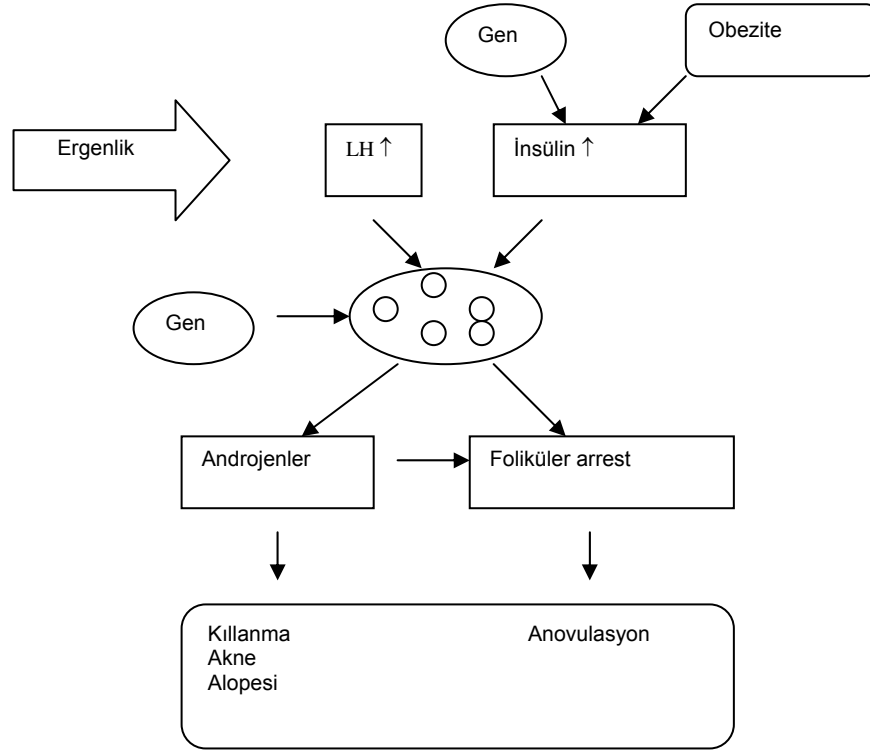
PKOS'lu kadınlarda oligo veya anovulator siklusların doğurganlık çağında infertilitenin en sık nedeni olduğu bilinmektedir. Bu olgularda tip 2 diyabet, dislipidemi, kardiovasküler hastalık ve endometrium kanser riskinin yüksek olduğu bildirilmektedir (Şekil 1). Ateroskleroza bağlı kalp-damar hastalıkları, yüksek tansiyon, gebelik diyabeti, over kanseri ve metabolik sendrom da önemli risk faktörleri arasında sayılmaktadır^{12,25,27}.



Şekil 1: PKOS ile ilişkili bulguların yaşa bağlı ortaya çıkış zamanları¹².

2.1.6 PKOS'un Etiyolojisi

PKOS'un nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte steroid hormon, gonadotropik hormon üretimi, androjen salınımında ifadelenen genlerde polimorfizmler ve glikoz toleransı, insülin direnci gibi metabolik bulguları içeren biyokimyasal faktörlerle etkileşim halinde, genetik temelli over kaynaklı bir bozukluk olduğu konusunda çalışma sonuçları yaygındır⁸. Obezite ve ergenlik gibi çevresel faktörler insülin direnci gelişimini uyarmaktadır (Şekil 2). PKOS'lu hastalarda insülin salınımında tip 2 diabetekine benzer dengesizlik gözlenir^{7,8,26}.



Şekil 2: PKOS'ta etiyolojik faktörler²⁶.

2.1.7 PKOS'ta Glikoz Toleransı ve İnsülin Direnci

a- Glikoz toleransı

1921 yılında Fransız araştırmacılar Achard ve Thyers, karbonhidrat metabolizmasındaki bozukluklar ve kadınlarda androjen yüksekliği arasındaki ilişkiyi ilk kez tanımlamışlardır¹². 1980 yılında, obez PKOS'lu kadınlar ve obez kontrol grubu arasında oral glikoz tolerans testi ile yapılan karşılaştırmada PKOS'lu obez kadınların daha yüksek glikoz ve plazma insülin düzeylerine sahip oldukları gösterilmiştir. 1999 yılında ABD'de yapılan bir başka çalışmada, 254 PKOS'lu kadından % 40'ının glikoz intoleransına % 31'inin zayıflamış glikoz toleransına % 7.5'inin ise tip 2 diabete sahip olduğu bildirilmiştir. Bu oranlar yaş, ağırlık ve etnik köken bakımından yapılan karşılaştırmada kontrol grubuna kıyasla oldukça yüksek bulunmuştur. Obezite ve yaş, anormal glikoz toleransı için riski artırıyor olmalarına rağmen, söz konusu çalışmada obez olmayan ve genç PKOS'lu kadınların glikoz intoleransına sahip oldukları görülmüştür. Aynı çalışmada, glikoz intoleransı için etnik kökene kıyasla PKOS'un daha önemli bir risk faktörü oluşturduğu belirtilmiştir^{12,28}.

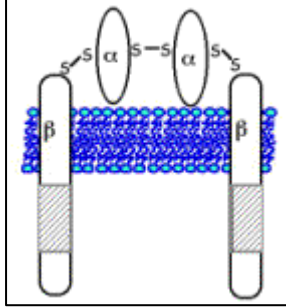
b- İnsülin Direnci

İnsülin, pankreasın β (beta) hücreleri tarafından salgılanan ve glikoz homeostasisinde baskın rolü olan polipeptid hormondur³⁰. Bu hormonun hedef dokuları karaciğer, kas ve yağ dokusudur. İnsülin, kas ve yağ dokusunda periferik glikoz alımını uyarır ve hücre büyümesi, farklılaşması ve protein sentezlenmesini indükler. İnsülin, glikojen depolanmasını uyarırken karaciğerde glikojen parçalanması ve glikoneogenezisi inhibe eder, aynı zamanda lipid parçalanmasında rol oynar^{29,30}.

PKOS'ta insülin faaliyetine karşı direnç gelişimi, genellikle normal insülin bağlanması halinde, yağ dokuda antilipolizis ve glikoz transportunda bu hormonun azalmış aktivitesini ifade eder¹². Bu insülin direnci, bu dirence daha az duyarlı olan diğer dokularda aşırı bir etkiye neden olabilecek şekilde hiperinsülinemiye yol açar. Bu etkiler, ovaryum teka hücreleri tarafından androjen salgılanması, bazal deri hücrelerinde aşırı büyüme, artmış vasküler ve endotelial tepki ve anormal hepatik ve periferik lipid metabolizması gibi durumları ortaya çıkarabilir. Örneğin, yükselmiş insülin düzeyleri ovaryumdan LH uyarımlı androjen salgılanmasını doğrudan artırır. Dolaşımda artmış insülin düzeyi, seks hormon bağlayıcı globulin düzeyini düşürür, böylece, serbest androjen düzeylerinde yükselmeye neden olur. Sonuç olarak, hiperinsülinemi PKOS'ta hiperandrojeneminin patogeneğinde önemli bir rol oynar²⁹.

PKOS'ta insülin direnci mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar insülin reseptörlerinde sinyal alımı sonrasında ileti defekti olduğunu göstermektedir³⁰. Normal koşullarda, insülin, reseptörün α (alfa) alt birimine bağlandığında hücre içine iletilen sinyal, protein fosforilasyonunu başlatmaktadır. İnsülin direnci olan olgularda tirozin yerine serin fosforile olmakta ve bu defekt hücre içinde sinyal iletiminin aksamasına ve insülin etkisinin azalmasına neden olmaktadır³⁰. Bu durum PKOS'lu hastaların yaklaşık % 50'sinde görülmektedir^{12,28}.

İnsüline duyarlı periferik hücrelerde insülinin etkileri hedef hücrelerin hücre zarlarında bulunan yüksek affiniteli reseptörlere insülinin bağlanmasıyla başlar. İnsülin reseptörü; IGF I, epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, platelet kaynaklı büyüme faktörü, koloni uyarıcı faktör I'i de içeren protein tirozin kinaz reseptörler ailesinin bir üyesidir. İnsülin reseptörü α ve β alt birimleri olan büyük bir transmembran proteinidir¹² (Şekil 3).



Şekil 3: İnsülin reseptörünün hücre zarında yerleşimi.

İnsülin molekülü hücresel etkilerini reseptörün α alt birimine bağlanarak başlatır. Bu bağlanma, β alt birimi üzerinde bulunan spesifik tirozin birimlerinin otofosforilasyonu ile sonuçlanır^{12,31}. β alt birimi, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. İnsülin reseptör substratları, çoklu tirozin fosforilasyon bölgeleri içeren sitoplazmik proteinlerdir. İnsülin stimülasyonu sonrası spesifik tanıma zincirlerine sahip sitozolik substratlar insülin reseptör substratlarına (IRS) bağlanır. IRS proteinleri üzerinde bulunan yapısal zincirler çeşitli fosforilasyon motifleri yolu ile sinyal proteinleri ile geniş etkileşim potansiyeli sağlar. İnsülin sinyal yollarının çeşitli yönlere ayrılması sinyal proteinlerinin IRS proteinlerine bağlanma aşamasında mümkün olur. Bu nedenle, IRS proteinleri, hücrenin metabolik anahtarları olarak düşünülebilir. İnsülin direnci durumlarında gözlenen azalmış glikojen sentezine glukoz transportunda izlenen yavaşlama neden olmaktadır^{28,29,30,31,32}.

Reseptör sonrası sinyal ileti defektlerinden bir diğeri ise, TNF (tümör nekroz faktör) α 'dır³³. Obez PKOS'lu olgularda artan TNF α , insülin reseptörü β alt birimin sayısını azaltıp, serin fosforilasyonunu artırarak insülin direncine katkıda bulunmaktadır³³. PKOS'ta insülin direnci gelişimi ile ilgili bir diğer faktör de inositol içeren fosfoglikanların azalmasıdır. İnositil ilavesi ile ovulasyonda düzelme ve androjen, lipid, insülin düzeylerinde düşme gözlenmiştir³⁴.

2.1.8 Genetik Nedenler

PKOS'un genetik nedenleri üzerine yapılan çalışmalarda henüz kesin ve net açıklamalara ulaşılamadığı anlaşılmaktadır. Örneğin, polikistik overi olan her kadında sendromun belirtilerinin görülmemesi ya da PKOS'lu kızların annelerinin polikistik over varlığına rağmen asemptomatik olmaları açıklanamamaktadır. Anne ve çocuklardaki hormon değerlerine bakıldığında genetik geçiş daha çok otozomal dominant forma uymaktadır^{35,37}. PKOS'lu kızların kız kardeşlerinin ise sendromun klinik ve laboratuvar özelliklerini % 46 oranında taşıdıkları gösterilmiştir. PKOS'lu hastalar insülin sekresyonunda tip 2 diabetekine benzer bozukluk gösterirler. Ayrıca bu hastaların yaklaşık % 50'sinin ebeveynlerinde tip 2 diabet varlığı gösterilmiştir^{35,36,37}.

2.2 PKOS'un Genetik Temelleri

PKOS patogenezinde, genetik faktörlerin önemli bir rol üstlenmiş oldukları konusunda kuşku olmamakla birlikte, kalıtımın yapısının tam olarak bilinmemesi ve ilgili çalışmalarda bir takım güçlüklerle karşılaşılması kesin sonuçlara ulaşılmasını engellemektedir. PKOS genetiğine ilişkin çalışmalarda ortaya çıkan sorunlara örnek olarak, primer etiyolojinin yeterince açık olmaması, fenotip tanımlarının yetersizliği, çalışma gruplarının heterojen olması ve çok sayıda aday genin varlığı sayılabilir^{38,39}. PKOS, çok sayıda farklı gen ile çevresel faktörlerin etkileşiminin sonucu olan bir bozukluk gibi görünmektedir. Literatürde genellikle ailesel yığılım, erkek fenotip, ikiz çalışmaları ve çevresel faktörler üzerinde durulduğu görülmektedir^{7,40}.

a- Ailesel yığılım

PKOS'lu olguların aile bireylerinde tip 2 diabet gelişme sıklığının toplum ortalamalarına göre yüksek olduğu bildirilmektedir^{41,42}. Yılmaz ve arkadaşları, PKOS'lu erişkin kadınların anne ve babalarında bozulmuş glikoz toleransı sıklığını sırasıyla % 40 ve % 52 olarak bildirmişlerdir⁴³. Bir başka araştırmada, PKOS'lu olguların ailelerinde tip 2 diabet sıklığı 1.2 kat yüksek bulunmuştur⁴⁴. 18 Beyaz PKOS'lu kadın ve kontrol grubu kadınlar arasında yapılan bir çalışmada ise, PKOS'lu hasta ve birinci derece yakınları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında PKO ve oligomenorenin artmış insidansı gösterilmiştir. Yapılan anketlerde bu ailelerde erkek bireylerde erken yaşta kelliğe giden saç dökülmesi de bildirilmiştir. Ayrıca, çalışmada kalıtım şeklinin otozomal dominant olduğu da vurgulanmıştır⁷.

Hasta bireylerin ailelerinde hiperandrojenemiye ek olarak, insülin direnci prevalansı bildirilmiştir. Türk populasyonunda, Yıldız ve arkadaşları, 52 PKOS hastası ve bu hastaların 102 akrabası üzerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar, cinsiyet, yaş, pre veya post menapozal durum gibi ölçütlere göre oluşturulmuş kontrol grupları ile PKOS'lu hastaların akrabalarını karşılaştırmışlar ve PKOS hastalarının anneleri, kız kardeşleri ve erkek kardeşlerinde insülin direncinin ve karbonhidrat metabolizma bozukluklarının daha sık olduğunu, ayrıca PKOS'lu kadınların anne ve kızkardeşlerinde serum androjen hormon düzeyinde artış bulunduğunu bildirmişlerdir⁴⁵. Bir başka çalışmada da, PKOS'lu bireylerin kızkardeşlerinde, hiperandrojenemi varlığı ve artmış LH değerleri bulunduğu gösterilmiştir. Bu şekilde biyokimyasal anomalilerin PKOS'lu olgu yakınlarında bulunması PKOS'un genetik temelinde ailesel yığılmanın varlığını önermiştir⁴⁶.

PKO görünümü ve erkek tarzı erken saç dökülmesinin kalıtım şekli PKOS ailelerinde otozomal dominant kalıtım şekli ile uyumludur. Bu duruma aynı gen yol açıyor olabilir. PKOS olmayan kadınların ailelerinde bu tür bir genetik etki yoktur⁴⁷.

b- Erkek fenotipi

PKOS'lu olguların ailelerine ilişkin kesin olarak tanımlanmış erkek fenotipinin bulunmaması, PKOS'un genetik orijini konusundaki çalışmalardaki ilerleyişi sınırlandırmıştır. İlk çalışmalarda, erkekte erken saç dökülmesi PKOS'un erkekteki karşılığı olarak önerilmişse de, bu evrensel olarak doğrulanamamıştır. Daha yakın zamanlarda, PKOS'lu hastaların erkek kardeşlerinde artmış serum DHEAS düzeyi ve PKOS'lu kadınların babalarında ve erkek kardeşlerinde insülin direnci erkek fenotipi olarak önerilmiştir. Erkek PKOS akrabaları ve kontrol grubu arasında serum DHEAS düzeyleri ve insülin direnci indeksleri bakımından ciddi miktarda örtüşme bulunmuştur. Bu anomalinin PKOS'lu olguların erkek yakınlarındaki belirleyicisi olarak kabul edilebilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır^{48,49,50,51}.

c- İkiz Çalışmaları

PKOS'un kalıtsallığına ilişkin araştırmalarda, ikiz çalışmalarına da yer verilmiştir. Çift yumurta ikizleri, tıpkı normal kardeşler gibi, genlerin % 50'sini paylaşırlarken, tek yumurta ikizleri tüm genlerini paylaşırlar. Tek yumurta ikizlerinde çift yumurta ikizlerine kıyasla, daha sıklıkla PKOS görünüyorsa, genetik etkiye işaret etmektedir. İkiz çalışmalarının verileri, fenotipik değişkenlikte genetik etkileri ve çevresel etkileri birbirinden ayırt etmeye de yarar. Genetik etkiler, çift yumurta

ikizleri ve normal kardeşlere kıyasla tek yumurta ikizlerinde daha yoğun görülür. Çevresel etkiler de, bireylere özgü olabileceği gibi aile üyeleri tarafından paylaşılıyor da olabilir^{52,53}. İkiz kardeşlerde PKOS ile ilgili olarak oldukça az veri bulunmaktadır. Jahanfar ve ekibi 11'i US yönünden PKO taşımayan 19 monozigotik ve 15 dizigotik olmak üzere 34 ikiz kardeş üzerinde çalışmışlardır. Çalışma sonucuna göre yüksek insülin düzeyleri, serum androstenoidol glukuronad ve vücut kitle indeksinin genetik faktörlerden etkilenmiş olduğunu öne sürmüşlerdir. Daha ileri çalışmalarda, dolaşımda normal ile uyumsuz lipid profilleri de gösterilmiştir. Bu durumun sadece PKO ile uyumlu ikizlerde söz konusu olduğu bildirilmiştir. Bu veriler, PKOS'a eşlik eden metabolik anomaliler için genetik bileşenlerin varlığına işaret etmektedir. Fakat, içinde çevresel faktörlerin de ciddi rol oynadığı poligenik etiyoloji önerilmektedir⁵³.

d- Çevresel Faktörler

PKOS'ta ailesel yığılım genetik orijine işaret etmekte, ancak aile içindeki bireylerde bu sendromun varlığının çevresel faktörlerle de geliştiği kabul edilmektedir⁵⁴.

PKOS'un klinik varlığında ortaya çıkan etnik farklılıkların beslenme alışkanlığı, egzersiz sıklığı ve yaşam tarzı gibi çevresel faktörlerle bağlantılı olabileceği ileri sürülmüştür. Beslenme sırasında alınan doymamış yağ asidi zincirlerinin poli veya mono olması bile, sendromun metabolik ortaya çıkışını etkileyebildiği bildirilmiştir. Bu yüzden PKOS'un gelişimini etkileyen çevresel faktörlerdeki farklılıklar nedeni ile bu sendromun gelişimine katkıda bulunan genler de çalışılan popülasyona bağlı olarak değişebilmektedir^{7,54,55}.

2.2.1 PKOS'ta Bazı Aday Genler

PKOS'ta bugüne kadar araştırılmış olan aday genler, steroid hormon sentezi ve faaliyetinde yer alan, karbonhidrat metabolizması ve enerji homeostasisinde yer alan, gonadotropin faaliyetinde ve düzenlenmesinde yer alan ve insülin metabolizmasında yer alan genlerdir. Bu aday genler, belirli PKOS bulgularından sorumlu olabilecekleri için seçilmişlerdir. PKOS'un birçok hücre tipini etkilediği bilindiği için, hücresel sinyal iletiminde yer alan genlerin en uygun aday genler olarak görüldükleri söylenebilir^{54,56}. Bu aday genlerden bazıları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: PKOS'ta aday genler⁴².

Aday gen	Polimorfizm	Kromozom yerleşimi
Ovaryan ve adrenal steroidogenez genleri		
CYP 11 α	(tttta) _n	15q23-24
CYP 21	Heterozigot CYP 21 mutasyonları	6p21.3
CYP 17	Promotor bölge T/C	10q24.3
CYP 19	Aromataz SNP 50	15p21.1
Steroid hormon ilişkili genler		
Androjen reseptör geni (AR)	(CAG) _n	Xq11-12
Seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG)	(TAAAA) _n	17p12-13
Gonadotropin metabolizma genleri		
LH β	Trp8Arg Ile15Thr	19q13.32
Follistatin	D5S474 D5S623 D5S822	5q11.2
İnsülin metabolizma genleri		
İnsülin geni (INS)	INS VNTR	11p15.5
İnsülin reseptör geni (INSR)	Ekson 17 C/T	19p13.3
IRS	Gly972Arg	2q36
Calpain 10	SNP -44,-43,-19,63	2q37
Enerji metabolizması genleri ve diğer genler		
Leptin	(ttttt) _n ins	7q31.3
Adiponektin	Ekson 2 T45G	3q27
TNF α	-308G/A	6p21.3
PAI 1	4G5G	7q21.3-q22

2.3. Calpain 10 geni

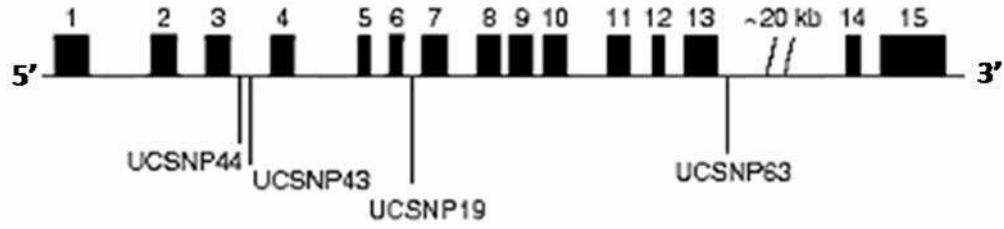
Bu çalışmanın konusunu oluşturan aday genlerden birincisi olan Calpain 10 geni Calpain ailesinin bir üyesidir.

Calpain'ler, aktivite gösterebilmek için Ca^{++} iyonlarına ihtiyaç duyan stoplazmik sistein proteazlardır⁶⁰. Fizyolojik fonksiyonları tam olarak aydınlatılamamış olmasına karşın trombosit aktivasyonu, membran füzyonu, apoptoz, farklılaşma, hücre döngüsünün devamlılığı ve sinyal iletimi gibi hücreSEL Ca^{++} düzenleyici faaliyetlerde bulunmaktadır. Aktivitesinin düzenlenmesindeki bozukluklar nöronal dejenerasyon, Alzheimer, metastaz gibi patolojilere yol açabilmektedir⁶⁰.

Moleküler çalışmalar, Calpain'lerin insandan mikroorganizmalara dek uzanan süper aile olduğunu göstermektedir. İnsanlardaki hastalıklar ve Calpain geni mutasyonları arasındaki ilişkilerin keşfi nedeni ile üç boyutlu yapıları ve Ca^{++} uyarımlı aktivasyon mekanizmaları çalışılmaktadır^{60,61}.

Calpain 10'u kodlayan gen, 2. kromozom üzerinde (2q7.3) yerleşiktir⁶⁴. Onbeş eksondan oluşur, 31 kb'dır ve tip 2 diabette ilk klonlanan gendir^{61,62,63}. Horikawa ve ekibi, intron bölgesinde üç ayrı polimorfizm (UCSNP -43,-19,-63) tanımlamışlardır⁸⁴ (Şekil 4).

Calpain 10 geni, insülin salınımında önemli rolü olan bir sistein proteazdır. Bu gen, tüm erişkin ve fetal dokularda ifadenmektedir. En yüksek oranda kalp dokusunda daha sonra pankreas, böbrek ve karaciğer olmak üzere farklı düzeylerde ifadenmektedir. Calpain 10a'dan 10h'ye dek sekiz varyant tanımlanmıştır. Calpain 10 geninde genetik varyantlar serbest yağ asitleri ve insülin direnci ile ilişkilidir⁶³. Çalışmalar serbest yağ asitlerinin, insülin reseptörlerinin fazla fosforilasyonu sonucu reseptör kinaz aktivitesini azaltarak insülin direncini kuvvetlendiren protein kinaz C' yi aktive ettiğini göstermiştir. Bu nedenle, protein kinaz C'nin negatif regülasyonu insülin reseptör fosforilasyonunun devamlılığı için önemli bir faktördür. Calpain 10'un 3. intronundaki tek nükleotid polimorfizmi (UCSNP43), mRNA ifadenmesini etkiler. Protein kinaz C'nin pozitif regülasyonu, azalmış insülin sinyali ile sonuçlanır⁶⁵.

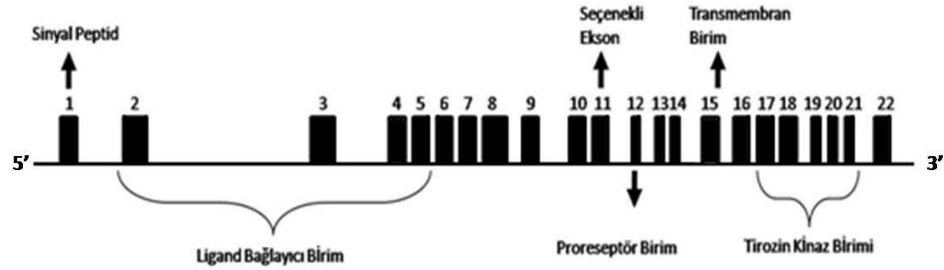


Şekil 4: Calpain 10 geninin yapısı⁶² (Eksonlar dikdörtgen ile intronlar ise çizgi ile gösterilmiştir).

2.4. İnsülin Reseptör Geni

Bu çalışmanın konusunu oluşturan aday genlerden ikincisi olan insülin reseptör geni, genomda 120 kb'lık yer kapsayan 22 ekson ve 21 introndan oluşan bir gendir⁵⁷ (Şekil 5). Kromozom 19 (19p13.3) üzerinde yerleşiktir. Genin protein kodlayan bölgeleri intronlar tarafından kesilmektedir⁵⁷. İnsülin, metabolik etkilerini gösterebilmek için önce hücre yüzey reseptörüne bağlanır⁵⁹. Gen üzerinde ilk 11 eksonluk bölge bu reseptörün α alt biriminin ifadenmesinden sorumludur ve 90 kb'lık büyüklüktedir. İkinci 11 eksonluk bölüm ise reseptörün β alt biriminin ifadenmesinden sorumludur ve 30 kb'lık büyüklüktedir. Translasyon başlama noktasının -276, -282 ve -283 bç'lik yukarısında üç ayrı transkripsiyon başlangıç noktası bulunmaktadır. Bu birimlere ek olarak promotor bölgeden 247 bç uzaklıkta maksimum promotor aktivitesinin % 62.6 'sını sağlayan bölge tanımlanmıştır. Bu promotor aktif bölge TATA benzeri dizilerden yoksundur. Ancak, transkripsiyon faktör Sp1 için iki bağlanma bölgesi içerir⁵⁷.

İnsülin reseptör genine ait eksonların büyük kısmı reseptörün yapısal ve fonksiyonel birimlerini kodlar. Ekson 1 sinyal peptidi, ekson 2 ligand bağlayıcı birim, ekson 3 sistein zengin birim, ekson 11 alternatif splicinge oluşan mini ekson, ekson 15 transmembran birim ifadenmesinden sorumlu olarak tanımlanmaktadır. Ekson 17-21 arası beş eksonluk bölüm ise tirozin kinaz birimi kodlarlar. Transmembran ve tirozin kinaz birimleri kodlayan eksonlar arasındaki tek ekson (ekson 16) ekson 22 gibi insülin reseptörünün karboksi terminal kuyruğunu kodlar. Ekson 2 - ekson 5 yapısal olarak epidermal büyüme faktörü genine benzerlik gösterir⁵⁷.



Şekil 5: INSR geninin yapısı⁵⁷. (Eksonlar dikdörtgen ile intronlar ise çizgi ile gösterilmiştir).

Olgun insülin reseptörü, iki α iki β alt birimden oluşan hetero tetramerik glikoproteindir. Bu alt birimler α alt birimindeki Cys-647 ve β alt birimindeki Cys-872 arasında disülfid bağları ile birbirlerine bağlanmaktadır⁵⁸.

İnsülin reseptör cDNA'nın klonlanması ile bu reseptöre ait iki izoform ortaya çıkmıştır. Bu izoformlar, α alt birimin karboksi terminal uç kısmındaki 12 aminoasit varlığı (HIR-B veya Ekson 11+) ya da yokluğu (HIR-A veya Ekson 11-) ile ayırt edilmektedir^{58,59}.

İnsülin reseptörünün klonlanmasıyla, bu gene ait aminoasit dizisini değiştirmeyen sessiz polimorfizmlerden başka, diziye değiştiren polimorfizmler de tanımlanmıştır. İnsülin reseptörü varyantlarından biri, glikoz toleransına sahip bireyler ve tip 2 diabetes mellitus hastalarında gösterilmiştir. Bu varyant Val $\rightarrow$ Met⁹⁹⁵ 'tir. Met varlığında insülin reseptörüne normal yolla bağlanır, IRS-1, PI3 yolu insülin uyarımlı kinaz aktivitesine sahip olduğundan metabolik ve mitojenik aktiviteler de normal olarak devam eder. Bu nedenle, bu polimorfizm hücrel insülin direncine yol açmaz^{58,59}.

Tip 2 diabetes mellitus hastalarda Lys $\rightarrow$ Glu¹⁰⁶⁸ varyantı tanımlanmıştır. Bu polimorfizm, tirozin kinaz aktivitesini düzenleyici bölümde gösterilmiştir. Bir başka polimorfizm de, Arg $\rightarrow$ Gln¹¹⁶⁴ 'dir. Bu varyantın olduğu durumlarda, bazal tirozin kinaz aktivitesinde artışa neden olurken, insülin yanıtı ya azalmıştır ya da hiç yanıt yoktur⁵⁹.

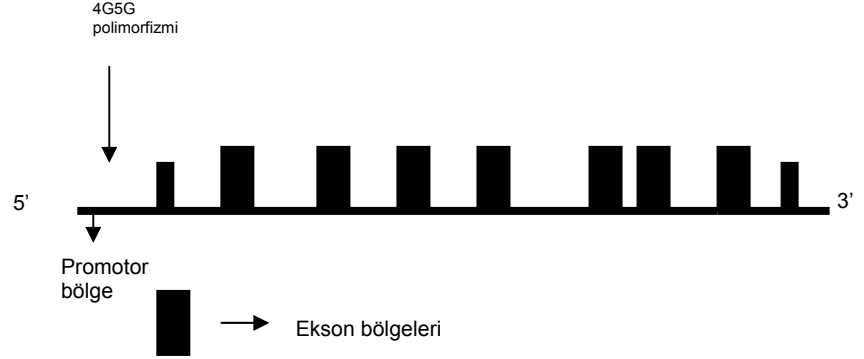
INSR geninin 13.eksonunda Thr→Ala⁸³¹ değişimi gösterilmiştir. Ayrıca, 22.eksonda Tyr→Cys¹³³⁴ polimorfizmi de tanımlanmıştır. Memeli hücrelerinde yapılan transfeksiyon çalışmalarında bu varyant ifadenmelerinin normal fonksiyona sahip olduğu gsterilmiřtir⁵⁹.

2.5. Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 (PAI-1) Geni

Bu çalışmanın konusunu oluşturan aday genlerden üçüncüsü olan PAI-1 geni, 7.kromozom (7q21.3-q22) zerinde yerleşiktir. 12.2 kb'lik büyüklükte 9 ekson ve 8 introndan oluşmaktadır^{66,67} (şekil 6). Her intron bölgesi GT ile başlar, AG ile sonlanır. Ekson bölgeleri, 83 b'den 1829 b'ne değişen büyüklükte bulunmaktadır⁶⁶. Bu genin promotor bölgesini içeren 5' ucunda ve kodlanmayan 3' terminal ucunda çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. -153 b uzağında (CA)_n, -675 b uzağında 4G/5G ve -844 b uzağında G/A olmak üzere, 4. intronda (CA)_n, 8.eksonda 9785 bç'de G/A ve 3' terminal uçta 11053 bç'de T/G, 11320 b +/- CGCGCCCC, 12078 bç'de G/A değişimleri yaygın olarak gsterilmektedir^{67,68}.

PAI-1, 48 kD moleküler ağırlığa sahip fosforile glikoproteindir. Endojen fibrinolitik sistemin primer inhibitörüdür ve serin proteaz inhibitör ailesinin bir üyesidir. PAI-1, ovaryum, kardiyak myositler, karaciğer ve adipositleri içeren çeşitli doku ve organlarda ifadenir. İnflamatuvar aracılar, glikoz, insülin ve çok düşük dansiteli lipoproteinler gibi çevresel ajanlar ve genetik faktörler PAI-1 sentezini düzenleyici olarak rol oynamaktadırlar⁶⁹.

PAI-1 genine ait yaygın 4G/5G (insersiyon/delesyon) polimorfizmi promotor bölgede -675 pozisyonunda gsterilmiştir^{67,68,69}.



Şekil 6: PAI-1 geni yerleşimi ve 4G5G polimorfizmi⁶⁸

PAI-1, maternal dokudan plasentanın ayrılması ve plasenta gelişiminin erken evrelerinde fibrinolitik aktivitede temel rol oynamaktadır. Plazminojen aktivatör inhibitörleri, plasental villus içi boşluklarda kan akımının sağlanmasında ve uterusun trofoblast invazyonunda faaliyet gösterirler⁷⁰. Ayrıca, tromboembolik olaylar ve myokardial infarktüste de anahtar rol oynarlar^{69,70}.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Cihazlar

- Masaüstü mini santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- Spin santrifüj (Biosan, Rusya)
- Hassas terazi (AND-ER-182A, ABD)
- Vorteks (Biosan, Rusya)
- Mikropipetler (Bt10, Bt100, Bt1000 Beta pipetor, CLP, ABD)
- Thermal cycler (Otomatik ısı döngü cihazı) (Perkin Elmer Cetus, ABD)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan, Rusya)
- Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)
- Derin dondurucu (Sanyo, Japonya)
- Elektroforez güç kaynağı (Thermo, ABD)
- Elektroforez tankı (Thermo, ABD)
- UV transluminator (Fotodyne, ABD)
- Gel Logic 100 jel görüntüleme sistemi (Kodak, ABD)
- Otomatik DNA dizi analizi sistemi (ABI, ABD)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- EZ-DNA DNA izolasyon kiti (Dr. Zeydanlı, Türkiye)
- RBC Lizis çözeltisi (Dr. Zeydanlı, Türkiye)
- Primer sentezleri (Biotech, Almanya)
- PCR tamponu (Bioron, Almanya)
- Agaroz (Agaroz (Sigma, ABD)
- Borik asit (Merck, Almanya)
- EDTA (Etilendiamintetraasetikasit disodyum dihidrat) (Sigma, ABD)
- *Fau*NDI, *Bst*FNI, *Hha*I, *Pml*I, *Bsl*I restriksiyon enzimleri ve tamponları (Bioron, Almanya)
- dNTP karışımı (Bioron, Almanya)
- Taq DNA polimeraz (Bioron, Almanya)
- MgCl₂ (Fermantas, ABD)
- Trizma baz (Sigma, ABD)
- Gliserol (Sigma, ABD)
- Orange G (Sigma, ABD)
- Sodyum asetat (Sigma, ABD)
- EtidyumBromür (Sigma, ABD)

- 100 b.ç.'lik moleküler ağırlık belirteci (AMRESCO, Almanya)
- BigDye® terminator V3.1 dizi analizi kiti (ABI, ABD)
- Invisorb PCR sonrası saflaştırma kiti (Invitek, Almanya)

3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı

3.2.1. 5X TBE Çözeltisi Hazırlanışı

Trizma Baz	54	g
Borik Asit	27,5	g
0,5 M EDTA (pH: 8)	20	ml

Kimyasallar çözüldükten sonra 1 litre olacak şekilde üzerine distile su eklendi.

3.2.2. 1X TBE Çözeltisi Hazırlanışı

200 ml 5X TBE, distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3.2.3. Orange G Jel Yükleme Boyası Hazırlanışı

Gliserol	55	ml
Orange G	100	mg
1X TBE çözeltisi	45	ml

Son hacim 100 ml' ye distile su ile tamamlandı.

3.2.4. Stok Etidyum Bromür Çözeltisi Hazırlanışı

10 mg etidyum bromür 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

3.2.5. 3X Sodyum Asetat (NaOAc) Çözeltisi Hazırlanışı

NaOAc $\cdot$ 3H ₂ O	0,04	g
---------------------------------	------	---

80 ml distile suda çözüldükten sonra, glasial asetik asit ile (pH:4,6)'ya ayarlanarak hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3.3. Agaroz Jel Hazırlanışı

% 2'lik agaroz jel hazırlamak için 2 g, % 3'lük agaroz jel hazırlamak için 3 g agaroz hassas terazide tartıldı. 1X TBE çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı. Mikrodalga fırın kullanılarak kaynatıldı. Agarozun homojen bir şekilde erimesinden ve sıcaklık 60 °C'ye düştükten sonra 3 µl etidyum bromür eklendi. Hazırlanan karışım elektroforez tepsisine döküldü. Jel donduktan sonra yatay elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin üzerini örtecek şekilde 1X TBE çözeltisinden eklendi. PCR ürününden 10 µl alınarak, 5 µl orange G jel yükleme boyası ile karıştırıldı. Örnekler yüklendikten sonra moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 20 dakika 150 volt sabit akımda yürütüldü. Ultraviyole (UV) transiluminator altında moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırılarak CAPN 10 SNP 19 polimorfizmlerini içeren bölge, SNP 43 polimorfizmini içeren 175 bp'lik, SNP 44 polimorfizmini içeren 166 bp'lik, SNP 63 polimorfizmini içeren 192 bp'lik, insülin reseptör geni 17. ekson C/T polimorfizmini içeren 317 bp'lik, PAI 1 geni promotor 4G/5G polimorfizmini içeren 99 bp'lik uzunluğa denk gelen bantlar aranarak PCR ürünleri değerlendirildi. Sonuçlar kırmızı filtre altında jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip fotoğrafı çekildi.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Çalışma Grubu ve Klinik Özellikler

Ocak 2006 - Ocak 2007 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Endokrinoloji Bilim Dalına başvuran 48 PKOS'lu ergen kız çalışmaya alındı. Araştırmada, normal boy ve kiloda, sağlıklı, klinik ve laboratuvar olarak hiperandrojenemi bulgusu olmayan, yaş ve ergenlik dönemi olarak hasta grubu ile uyumlu, adet döngüleri düzenli 50 ergen kız kontrol grubunu oluşturdu.

PKOS tanısı 1990 NIH ve 2003 Rotterdam toplantısı kriterlerine göre konuldu²⁴.

Bu çalışma için GÜTF yerel etik kurulundan onay alındı. Moleküler genetik araştırma için bireylerden 0,5 M EDTA'lı tüpe 2 ml kan örnekleri alındı. Hem hasta hem de kontrol grubundaki bireyler çalışmaya alınmadan önce çalışma konusunda bilgilendirildi. Tüm olgulardan çalışma ile ilgili "olur formu" alındı.

PKOS'lu hastaların bilgileri Tablo 2'de verilen hasta bilgi formunda bulunmaktadır. Bu bilgi formu hastaların dosyalarında mevcut olan bilgilere dayanarak dolduruldu.

Tablo 2: Çalışma kapsamına alınan bireylere ait bilgi formu

Ad Soyad
Boy (m)
Ağırlık (kg)
VKI (kg/m ²)
Hirsutismus skoru

3.4.2. Genomik DNA Saflaştırılması

Kan örneklerinden genomik DNA saflaştırma işlemi EZ-DNA DNA izolasyon kiti kullanılarak aşağıda yazılı protokole göre yapıldı.

1. 1.5 ml'lik ependorf tüpüne; 1.0 ml kırmızı kan hücresi (RBC) lizis çözeltisi ve 500 µl kan örneği eklendi.
2. Vortekslendi. 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
3. 8000 rpm de 5 dakika santrifüjlendi, üzeri atıldı.
4. 1 ml kırmızı kan hücresi (RBC) lizis çözeltisi eklendi.
5. Vortekslendi. 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
6. 8000 rpm de 5 dakika santrifüjlendi, üzeri atıldı.
7. Üzerine 500 µl DNA'yı çöktürme çözeltisi eklenerek karıştırıldı.
8. Vortekslendi. 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
9. Üzerine 500 µl % 99.5 lik etanol eklendi. 5 dk bekletildi.
10. 12000 rpm de 5 dakika santrifüjlendi. Üzeri atıldı.
11. 500 µl % 75 lik alkol ile 1-2 dakika bekletildi.
12. 12000 rpm de 5 dakika santrifüjlendi. Üzeri atıldı.
13. Pelet kurutuldu. 250-300 µl distile su ile sulandırıldı.
14. 15-20 dakika 65 °C'de bekletildi.
15. Genomik DNA kullanıma hazır hale geldi.

3.4.3. Calpain 10 geni SNP -44 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR İle Çoğaltılması

Calpain 10 geni SNP -44 polimorfizmini içeren bölge özgül primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Calpain 10 geni 3. intronda SNP 44 bölgesine ait 166 bp'lik bölümü çoğaltmada kullanılan

primerler Tablo 3'te, bölgenin genomdaki yerleşimi Şekil 7'de gösterilmiştir.

```
CATAGCTTCCACGCCTCCTGCCCTGCTCCTGTGCCCACACCGGATGCCAGAGA
GTTTCTGTGTGTG
5'-GCAGGGCGCTCACGCTTGCCG-3'
GGCAGAGGACTGCAGGGCGCTCACGCTTGCTGGAAGTAAGGCGTTTGAAGGT
GAGGCTAAGCCTTGACTTGGTGAGGATGAGGAAGAAGGCAGAGGGGAGTAAAG
AGGTGGGATTGAGGCAGCGGTTG
3'-CTTAGTCTCTCCCCCGGTACG-5'
GACGATTTGGGGTGCTACAGACCATGGGAATCAGAGAGGGGGCCATGCTCAAT
GCCAGAGGCTCACTCCCATGGTGATTGTGTCCCCTAGGGTCCATGGGTCCTACG
AGCACCTGTGGGCCGGGCAGGTGGCGGATGCCCTGGTGGACCTGACCGGCGG
CCTGGC
```

Şekil 7: CAPN 10 geni SNP -44 polimorfizmine ait 166 bp'lik bölgenin genomdaki yerleşimi. ENSG00000142330, Calpain-10 (Calcium-activated neutral proteinase 10) (CANP 10).

3.4.4. Calpain 10 geni SNP -43 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR İle Çoğaltılması

Calpain 10 geni 3. intronda SNP -43 polimorfizmini içeren bölge özgül primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Calpain 10 geni SNP -43 bölgesine ait 175 bp'lik bölümü çoğaltmada kullanılan primerler Tablo 3'te, bölgenin genomdaki yerleşimi Şekil 8'de gösterilmiştir.

```
5'- GCAGGGTTGGAGCTTGAGAG -3'
TTTAGGAAAAGCAGGGTTGGAGCTTGAGAGCCAAGGGATGTGGGCATCCATAGCTT
CCACGCCTCCTGCCCTGCTCCTGTGCCCACACCGGATGCCAGAGAGTTTCTGTGT
GTGGGCAGAGGACTGCAGG
3'-AaACTTCCAACCTCCGATTCCGGAAGTAA-5'
GCGCTCACGCTTGCTGTGAAGTAAGGCCTTGAAGGTGAGGCTAAGCCTTGACTTG
GTGAGGATGAGGAAGAAGGCAGAGGGGAGTAAAGAGGTGGGATTGAGGCAGCGG
TTGGACGATTTGGGGTGCT
```

Şekil 8: CAPN 10 geni SNP 43 polimorfizmine ait 175 bp'lik bölgenin genomdaki yerleşimi. ENSG00000142330, Calpain-10 (Calcium-activated neutral proteinase 10) (CANP 10).

3.4.5. Calpain 10 geni SNP -19 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR İle Çoğaltılması

Calpain 10 geni 6.intronda SNP -19 polimorfizmini içeren bölge özgül primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Bu polimorfizmi içeren bölgeye ait bölümü çoğaltmada kullanılan primerler Tablo 3'te, bölgenin genomdaki yerleşimi Şekil 9'da verilmiştir.

```
AGGTAGTGCCCCGAGGGGCTGTGCTGGGCACGTGCTCTGCCTGCCGAAGTGAG
GAGGCTGGGCAG
                    5'- CAGTTTGGTTCTCTTCAGCG -3'
GTGCCTGGGTTCCCCCTGCCAGGCCAGTTTGGTTCTCTTCAGCGTGGAGAG
ATGATTCTGTCCAGGAGCCGGGAGGAGGGTGATGATTCTGTCCAGGAGCTG
GGAGGAGGGTGGGCTTGTGGGAGG
                    3'-CGACGACGAATCTGGGACG-5'
GGCTGGCTCTGTCTGTGGCCGTAGCTGCTGCTTAGACCCTGCCAGGGTTCATGA
GGCCACCATGGC
```

Şekil 9: CAPN 10 geni SNP 19 polimorfizmine ait bölümün genomdaki yerleşimi. ENSG00000142330, Calpain-10 (Calcium-activated neutral proteinase 10) (CANP 10).

3.4.6. Calpain 10 geni SNP -63 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR İle Çoğaltılması

Calpain 10 geni 13. intronda SNP -63 polimorfizmini içeren bölge özgül primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Calpain 10 geni SNP -63 bölgesine ait 192 bç'lik bölümü çoğaltmada kullanılan primerler Tablo 3'te, bölgenin genomdaki yerleşimi Şekil 10'da gösterilmiştir.

5'AAGGGGGGCCAGGGCCTGACGGGGGTGGcG-3'
CTCGGTCAGAGCCCTAGCACCCAAGGGGGGCCAGGGCCTGACGGGGGTGGAGC
GAGGGGTGGGCCGCGTCTGTGCAGGCTCAGAAGCTTCCTAAGAGGCTGGAGAGT
GGAACCTTCAGGCACCACGCACTGCCTCCTCCCTGCCACGGTCCTGGTTTCTCC
AGATGGGGCCTTGGCCTTGGCTA
3'-CTAGCTCTCGACCCTCACGA-5'
GGTGTGATCAGGAGCTGGGAGTGCTGCGCCCCGCCAACTTCTCCAACTCCA
GCCAGGGCACCTCAGTGAGGCCTCAGCCACCTGCGCCTTATTTGCTTCCTCCTTG

Şekil 10: CAPN 10 geni SNP -63 polimorfizmine ait 192 bç'lik bölgenin genomdaki yerleşimi. ENSG00000142330, Calpain-10 (Calcium-activated neutral proteinase 10) (CANP 10).

Tablo 3: CAPN 10 geni SNP - 44, - 43, - 19, - 63 polimorfizmlerini içeren bölgelerin PCR tepkimesinde kullanılan primerler.

Hedef Bölge	Primer Çifti
-44	İleri 5'- GCAGGGCGCTCACGCTTGCCG -3' Geri 5'- GCA TGG CCC CCT CTC TGA TTC-3'
-43	İleri 5'- GCAGGGTTGGAGCTTGAGAG -3' Geri 5'- AAG TCA AGG CTT AGC CTC ACC TT ATA -3'
-19	İleri 5'- CAGTTTGGTTCTCTTCAGCG-3' Geri 5'- GCAGGGTCTAAGCAGCAGC -3'
-63	İleri 5'-AAGGGGGGCCAGGGCCTGACGGGGGTGGcG-3' Geri 5'-AGCACTCCCAGCTCTCGATC-3'

3.4.7. Calpain 10 geni SNP -44, -43, -19, -63 Polimorfizmlerini İçeren Bölgelerin PCR Tepkime Karışımı

PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için 2,5 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, 50 pmol/µl her iki primerden, 1,0 U/µl Taq DNA polimeraz enzimi ve PCR tamponu kullanıldı. PCR karışımı ince çeperli 0,2'lik PCR tüplerine dağıtıldıktan sonra saflaştırılan genomik DNA eklendi. PCR tüpünde son hacim 50 µl olup içeriği Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4: Calpain 10 geni SNP -44, -43, -19, -63 polimorfizmlerini içeren bölgelerin PCR tepkime karışımı

Polimorfizm	DNA 250 g/ml	10X PCR tamponu	Primerler 100 pmol/μl	MgCl ₂ (2.5 mM)	dNTP (10 mM)	Taq DNA polimeraz 5 U/μl	dH ₂ O	Toplam Hacim
-44	3 μl	5 μl	0,5 μl	3 μl	1 μl	0,2 μl	37,3 μl	50 μl
-43	3 μl	5 μl	0,5 μl	3 μl	1 μl	0,2 μl	37,3 μl	50 μl
-19	3 μl	5 μl	0,5 μl	3 μl	1 μl	0,2 μl	37,3 μl	50 μl
-63	3 μl	5 μl	0,5 μl	3 μl	1 μl	0,2 μl	37,3 μl	50 μl

3.4.8. CAPN 10 geni SNP -44, -43, -19 ve -63 polimorfizmlerini içeren bölgeleri çoğaltmak için kullanılan PCR programı

Her bir bölge için PCR işlemini gerçekleştirmek amacıyla otomatik ısı döngü cihazı Tablo 5'te belirtilen sıcaklık ve süreler göre ayarlanmıştır. Program sonunda hedef DNA bölgesi çoğaltılmıştır.

Tablo 5: CAPN 10 geni SNP -44, -43, -19 ve -63 Polimorfizmlerini İçeren Bölgeleri Çoğaltmak İçin Kullanılan PCR Programı

polimorfizm	Başlangıç denatürasyonu (1 döngü)	Tepkime Döngüsü (30 Döngü)			Son Sentez Aşaması (1 döngü)
		Denatürasyon aşaması	Hibridizasyon aşaması	Sentez (Uzama) aşaması	
-44	94 °C'de 5 dk	94 °C'de 30 sn	60 °C'de 60 sn	72 °C'de 90 sn	72 °C'de 5 dk
-43	94 °C'de 5 dk	94 °C'de 30 sn	55 °C'de 60 sn	72 °C'de 90 sn	72 °C'de 5 dk
-19	94 °C'de 5 dk	94 °C'de 30 sn	60 °C'de 60 sn	72 °C'de 90 sn	72 °C'de 5 dk
-63	94 °C'de 5 dk	94 °C'de 15 sn	55 °C'de 15 sn	72 °C'de 30 sn	72 °C'de 5 dk

3.4.9. CAPN 10 geni SNP -44, -43, -19 ve -63 Polimorfizmlerini İçeren Bölgelere Ait PCR Ürünlerinin Analizi

PCR ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi için hazırlanan kimyasal karışımların içerikleri belirtilmiştir. Bu bölge için % 2'lik agaroz jel hazırlanmıştır.

3.4.10. CAPN 10 geni SNP - 44, -43, -19 ve -63 Polimorfizmlerini İçeren Bölgelere Ait PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri İle Kesimi

Elde edilen PCR ürünleri belirli restriksiyon enzimleri eşliğinde kesime tabii tutuldu. Bu kesimlerle ilgili bilgiler Tablo 6 'da verilmiştir.

Tablo 6: CAPN 10 geni SNP -44, -43 ve -63 polimorfizmlerini içeren bölgelerin enzim kesiminde kullanılan enzimler ve bu enzimlere ait bilgiler

Polimorfizm	Restriksiyon Enzimi	Enzimin Çalışma Sıcaklığı (°C)	Enzim Tanıma Bölgesi	PCR Ürün Büyüklüğü (bç)	Enzim Kesiminden elde edilen parçaların büyüklüğü (bç)
-44	<i>Bst</i> FNI	60	CG↓CG	166	C aleli kesim var T aleli kesim yok
-43	<i>Fau</i> NDI	37	CA↓TATG	175	G aleli; kesim yok (175 bç) A aleli; kesim var (148+27 bç)
-63	<i>Hha</i> I	37	GCG↓C	192	C aleli: (162+30 bç) T aleli: kesim yok

3.4.11. Calpain 10 SNP -44 İçeren Bölgenin PCR Ürünlerinin *Bst*FNI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

*Bst*FNI, *Bacillus stearothermophilus* türünden elde edilen bir restriksiyon enzimidir. *Bst*FNI, çift zincirli DNA'yı 5'-CG↓CG-3' tanıma bölgesinden tanıyarak kesim yapar. PCR tepkimesi sonrası 166 bç'lik PCR ürünü *Bst*FNI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede timin (T) içeren alel *Bst*FNI enzimi için kesim noktası içermez. Sitozin (C) içeren alel ise ilgili enzim için kesim noktası taşımaktadır. Dolayısıyla, enzim kesiminden sonra TT genotipli bireylerde 166 bç'lik tek bant, CC genotipli bireylerde

145 ve 21 bç'lik iki bant, heterozigot (TC) bireylerde ise 166, 145 ve 21 bç olmak üzere üç bant oluşur.

3.4.11.1. Deneyin Yapılışı

1. 1.5 ml'lik ependorf tüpünün içine 15 µl PCR ürünü konuldu.
2. Son hacim içerisinde 10 U 1 µl *Bst*FNI restriksiyon enzimi ve 1.8 µl 10 X Buffer O tamponu (pH 7,4; 25 °C) eklendi.
3. 60 °C' de bir gece kuru ısıtıcı blokta inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası tüplerin içine 5 µl Orange G jel yükleme boyası eklendi.
5. % 3'lük agaroz jelde moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 40 dakika 100 volt sabit akımda yürütüldü.

3.4.12. Calpain 10 SNP -43 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR Ürünlerinin *Fau*NDI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

*Fau*NDI, *Flavobacterium aquatile* türünden elde edilen tip 2 restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA'yı 5'-CA↓TATG-3' dizisinden tanıyarak kesim yapar. PCR tepkimesi sonrası, 175 bç'lik PCR ürünü *Fau*ND I restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede *Fau*NDI için tek kesim noktası bulunmaktadır. Bu noktada guanin (G) içeren alel *Fau*NDI enzimi için kesim noktası içermez. Adenin (A) içeren alel ise, ilgili enzim için kesim noktası taşımaktadır. Guaninden adenine (G→A) bir nükleotit değişimi olması halinde *Fau*NDI enziminin tanıdığı bölge oluşur ve kesim gerçekleşir. Dolayısı ile enzim kesiminden sonra nükleotit değişimi olmayan (GG) bireylerde 175 bç'lik tek bant, her iki alelinde nükleotit değişimi taşıyan (AA) bireylerde 148 ve 27 bç'lik iki bant, heterozigot (GA) bireylerde ise 175, 148 ve 27 bç'lik üç bant görülecektir.

3.4.12.1. Deneyin Yapılışı

1. 1.5 ml'lik ependorf tüpünün içine 15 µl PCR ürünü konuldu.
2. 18 µl son hacim içerisinde 10 U 1µl *Fau*NDI restriksiyon enzimi ve 1.8 µl 10X Buffer O tamponu (pH 7,4; 25 °C) eklendi.
3. 37 °C' de 16 saat kuru ısıtıcı blokta inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası tüplerin içine 5 µl Orange G jel yükleme boyası eklendi.
5. % 3'lük agaroz jelde moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 45 dakika 100 volt sabit akımda yürütüldü.

3.4.13. Calpain 10 SNP -63 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR Ürünlerinin HhaI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

HhaI, *Haemophilus haemolyticus* türünden elde edilen tip 2 restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA'yı 5'-GCG↓C-3' dizisinden tanıyarak kesim yapar. PCR tepkimesi sonrası 192 bp'lik PCR ürünü *HhaI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede timin (T) içeren alel *HhaI* enzimi için kesim noktası içermez. Sitozin (C) içeren alel ise ilgili enzim için kesim noktası taşımaktadır. Dolayısıyla, enzim kesiminden sonra TT genotipli bireylerde 192 bp'lik tek bant, CC genotipli bireylerde 162 ve 30 bp'lik iki bant, heterozigot (CT) bireylerde ise 192, 162 ve 30 bp olmak üzere üç bant oluşur.

3.4.13.1. Deneyin Yapılışı

1. 1.5 ml'lik ependorf tüpünün içine 15 µl PCR ürünü konuldu.
2. 18 µl son hacim içerisinde 10 U 1 µl *HhaI* restriksiyon enzimi ve 1.8 µl 10X Buffer O tamponu (pH 7,4; 25 °C) eklendi.
3. 37 °C' de bir gece kuru ısıtıcı blokta inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası tüplerin içine 5 µl Orange G jel yükleme boyası eklendi.
5. % 3'lük agaroz jelde moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 50 dakika 100 volt sabit akımda yürütüldü.

3.4.14. İnsülin Reseptör Geni Ekson 17 C/T Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR İle Çoğaltılması

Özgül primerler kullanılarak, insülin reseptör geni 17. ekson C/T polimorfizmini içeren bölge PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Bu C/T polimorfizmini içeren 317 bp'lik bölümü çoğaltmada kullanılan primerler Tablo 7'de, bölgenin genomdaki yerleşimi Şekil 11'de gösterilmiştir. Bu bölgede C/T polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak üzere hazırlanan tepkime karışımları Tablo 8'de verilmiştir.

5'-CCAAGGATGCTGTGTAGATAAG-3' GTGGCTGCAGACCCCCAAGGGATCCTCCAAGGATGCTGTGTAGATAAGTAAGAA GTAGTGTTCATGCTCTGTGTAYRTGCCGGACGAGTGGGAGGTGTCTCGAGAG AAGATCACCTCCTTCGAGAGCTGGGGCAGGGCTCCTTCGGCATGGTGTATGA GGGCAATGCCAGGGACATCATCAAGGGTGAGGCAGAGACCCGCGTGGCGGTG AAGACGGTCAACGAGTCAGCCAGTCTCCGAGAGCGGATTGAGTTCCTCAATGAG GCCTCGGTATGAAGGGCTTCACCTGCCATCACGTGGTGAGTCCAGTGGGGG 3'-CTGTACCCGACCGAAAGGACA-5' TGGGACATGGGCTGGCTTTCCTGACCCCTCCCTTCTCTGCCTCCTCCTCCTGC ACAGAGCGACAGA

Şekil 11 : INSR geni ekson 17 C/T polimorfizmine ait 317 bç'lik bölgenin genomdaki yerleşimi. Referans dizi; ENST00000302850, Insulin receptor precursor (IR) (CD220 antigen).

Tablo 7: INSR geni Ekson 17 C/T polimorfizmini içeren bölgelerin PCR tepkimesinde kullanılan primerler.

Hedef Bölge	Primer Çifti
Ekson 17 C/T	İleri 5'- CCAAGGATGCTGTGTAGATAAG -3' Geri 5'- ACAGGAAAGCCAGCCCATGTC -3'

3.4.14.1. İnsülin Reseptör Geni Ekson 17 C/T Polimorfizmini İçeren Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Tepkime Karışımı

PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için 2,5 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, 50 pmol/µl her iki primerden, 1,0 U/µl Taq DNA polimeraz enzimi ve PCR tamponu kullanıldı. PCR karışımı ince çeperli 0,2'lik PCR tüplerine dağıtıldıktan sonra saflaştırılan genomik DNA eklendi. PCR tüpünde son hacim 50 µl olup içeriği Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8: INSR Geni Ekson 17 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR Tepkime Karışımı

Polimorfizm	DNA 250 g/ml	10X PCR tamponu	Primerler 100 pmol/μl	MgCl ₂ (25 mM)	dNTP (10 mM)	Taq DNA polimeraz 5 U/μl	dH ₂ O	Toplam Hacim
Ekson 17 C/T	3 μl	5 μl	0,5 μl	3 μl	1 μl	0,2 μl	37,3 μl	50 μl

3.4.14.2. İnsülin Reseptör Geni Ekson 17 C/T Polimorfizmini İçeren Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Programı

Her bir bölge için PCR işlemini gerçekleştirmek amacıyla otomatik ısı döngü cihazı Tablo 9’da belirtilen sıcaklık ve sürelerle göre ayarlanmıştır. Program sonunda hedef DNA bölgesi çoğaltılmıştır.

Tablo 9: INSR Geni Ekson 17 Polimorfizmini İçeren Bölgenin Çoğaltılması için Kullanılan PCR Programı

Polimorfizm	Başlangıç denatürasyonu (1 döngü)	Tepkime Döngüsü (30 Döngü)			Son Sentez Aşaması (1 döngü)
		Denatürasyon aşaması	Hibridizasyon aşaması	Sentez (Uzama) aşaması	
Ekson17 C/T	94 °C’de 5 dk	94 °C’de 30 sn	55 °C’de 60 sn	72°C’de 90 sn	72°C’de 5 dk

3.4.14.3. İnsülin Reseptör Geni Ekson 17 C/T Polimorfizmini İçeren Bölgeye Ait PCR Ürününün Analizi

PCR ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi için hazırlanan kimyasal karışımların içerikleri belirtilmiştir. Bu bölge için % 2’lik agaroz jel hazırlanmıştır.

3.4.15. İnsülin Reseptör Geni Ekson 17 C/T Polimorfizmini İçeren Bölgeye Ait PCR Ürününün Restriksiyon Enzimi İle Kesimi

Elde edilen PCR ürünleri belirli restriksiyon enzimi eşliğinde kesime tabii tutuldu. Bu kesimlerle ilgili bilgiler Tablo 10 'da verilmiştir.

Tablo 10: INSR Geni Ekson 17 C/T Polimorfizmini İçeren Bölgenin Enzim Kesiminde Kullanılan Enzim ve Bu Enzime Ait Bilgiler

Polimorfizm	Restriksiyon Enzimi	Enzimin Çalışma Sıcaklığı (°C)	Enzim Tanıma Bölgesi	PCR Ürün Büyüklüğü (bp)	Enzim Kesiminden elde edilen parçaların büyüklüğü (bp)
Ekson 17 C/T	<i>Pml</i>	37	CAC↓GTG	317	C aleli; kesim var (274+43 bp) T aleli; kesim yok (317 bp)

3.4.15.1. İnsülin Reseptör Geni Ekson 17 C/T Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR Ürününün *Pml* Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

Pml, *Pseudomonas maltophilia* türünden elde edilen tip 2 restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA'yı 5'-CAC↓GTG-3' dizisinden tanıyarak kesim yapar. PCR sonrası, 317 bp'lik PCR ürünü *Pml* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede *Pml* için tek kesim noktası bulunmaktadır. Bu kesim noktalarından birinde polimorfik baz değişimi içermediği için tüm bireylerde kesim gerçekleşmektedir. Diğer kesim noktası polimorfiktir. Dolayısı ile enzim kesiminden sonra TT genotipli bireylerde 317 bp'lik tek bant, CC genotipli bireylerde 274 ve 43 bp'lik iki bant, heterozigot CT genotipli bireylerde ise 317, 274 ve 43 bp'lik üç bant görülecektir.

3.4.15.2. Deneyin Yapılışı

1. 1.5 ml'lik ependorf tüpünün içine 15 µl PCR ürünü konuldu.
2. 18 µl son hacim içerisinde 10 U 1µl *Pml* restriksiyon enzimi ve 1.8 µl 10X Buffer O tamponu (pH 7,4; 25 °C) eklendi.
3. 37 °C' de 16 saat kuru ısıtıcı blokta inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası tüplerin içine 5 µl Orange G jel yükleme boyası eklendi.

5. % 3'lük agaroz jelde moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 45 dakika 100 volt sabit akımda yürütüldü.

3.4.16. Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 Geni Promotor 4G/5G Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR İle Çoğaltılması

Tablo 11'de belirtilen özgül primerler kullanılarak polimorfizmi içeren bölge PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Plazminojen aktivatör inhibitör 1 geni promotor 4G/5G polimorfizmini içeren 99 bç'lik bölgenin genomdaki yerleşimi Şekil 12'de gösterilmiştir. Bu bölgede 4G/5G polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak üzere hazırlanan tepkime karışımları Tablo 12'de verilmiştir.

5'-CACAGAGAGAGTCTGGcCACGT-3'
GTTGTTGACACAAGAGAGCCCTCAGGGGCACAGAGAGAGTCTGGACACGTGGG
GAGTCAGCCGTGTATCATCGGAGCGGC
3'-TCTGGTTCTCAGGAGACAACC-5'
CGGGCACATGGCAGGGATGAGGGAAAGACCAAGAGTCCTCTGTTGGGCCCAAG
TCCTAGACAGACAAAACCTAGACAATCACGTGGCTGGCTGCATGCCCTGTGGCT
GTTGGGCTGGGCCCCAGGAGGAGGGAGGGGC

Şekil 12 : PAI-1 Geni Promotor 4G/5G polimorfizmine ait 99 bç'lik bölgenin genomdaki yerleşimi. Referans dizi; ENSG00000106366, Plasminogen activator inhibitor 1 precursor (PAI-1) (Endothelial plasminogen activator inhibitor) (PAI).

Tablo 11: PAI-1 Geni Promotor Polimorfizmini İçeren Bölgelerin PCR Tepkimesinde Kullanılan Primerler.

Hedef Bölge	Primer Çifti
Promotor 4G/5G	İleri 5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3' Geri 5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3'

3.4.16.1. Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 Geni Promotor 4G/5G Polimorfizmini İçeren Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Tepkime Karışımı

PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için 2,5 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, 50 pmol/µl her iki primerden, 1,0 U/µl Taq DNA polimeraz enzimi ve PCR tamponu kullanıldı. PCR karışımı ince çeperli 0,2'lik PCR

tüplerine dağıtıldıktan sonra saflaştırılan genomik DNA eklendi. PCR tüpünde son hacim 50 µl olup içeriği Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12: PAI-1 Geni Promotor 4G/5G Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR Tepkime Karışımı

Polimorfizm	DNA 250 g/ml	10X PCR tamponu	Primerler 100 pmol/µl	MgCl ₂ (25 mM)	dNTP (10 mM)	Taq DNA polimeraz 5 U/µl	dH ₂ O	Toplam Hacim
Promotor 4G/5G	3 µl	5 µl	0,5 µl	3 µl	1 µl	0,2 µl	37,3 µl	50 µl

3.4.16.2. Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 Geni Promotor 4G/5G Polimorfizmini İçeren Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Programı

Her bir bölge için PCR işlemini gerçekleştirmek amacıyla otomatik ısı döngü cihazı Tablo 13’de belirtilen sıcaklık ve sürelerle göre ayarlanmıştır. Program sonunda hedef DNA bölgesi çoğaltılmıştır.

Tablo 13: PAI-1 Geni Promotor 4G/5G Polimorfizmini İçeren Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Programı

Polimorfizm	Başlangıç denatürasyonu (1 döngü)	Tepkime Döngüsü (30 Döngü)			Son Sentez Aşaması (1 döngü)
		Denatürasyon aşaması	Hibridizasyon aşaması	Sentez (Uzama) aşaması	
Promotor 4G/5G	94 °C’de 5 dk	94 °C’de 30 sn	55 °C’de 60 sn	72 °C’de 60 sn	72 °C’de 5 dk

3.4.16.3. Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 Geni Promotor 4G/5G Polimorfizmini İçeren Bölgeye Ait PCR Ürününün Analizi

PCR ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi için hazırlanan kimyasal karışımların içerikleri belirtilmiştir. Bu bölge için, % 2'lik agaroz jel hazırlanmıştır.

3.4.17. Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 Geni Promotor 4G/5G Polimorfizmini İçeren Bölgeye Ait PCR Ürününün Restriksiyon Enzimi İle Kesimi

Elde edilen PCR ürünleri belirli restriksiyon enzimi eşliğinde kesime tabi tutuldu. Bu kesimlerle ilgili bilgiler Tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 14: PAI 1 Geni Promotor Bölge 4G/5G Polimorfizmini İçeren Bölgenin Enzim Kesiminde Kullanılan Enzim ve Bu Enzime Ait Bilgiler

Polimorfizm	Restriksiyon Enzimi	Enzimin Çalışma Sıcaklığı (°C)	Enzim Tanıma Bölgesi	PCR Ürün Büyüklüğü (bp)	Enzim Kesiminden elde edilen parçaların büyüklüğü (bp)
Promotor 4G/5G	<i>Bsl</i>	37	CCNNNNN↓NNGG	99	4G aleli; kesim yok (99 bp) 5G aleli; kesim var (23+77 bp)

3.4.17.1. PAI-1 Geni Promotor 4G/5G Polimorfizmini İçeren Bölgenin PCR Ürününün *Bsl* Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

Bsl, *Bacillus* türlerinden elde edilen tip 2 restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA'yı 5'- CCNNNNN↓NNGG -3' dizisinden tanıyarak kesim yapar. PCR tepkimesi sonrası 99 bp'lik PCR ürünü *Bsl* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede *Bsl* için tek kesim noktası bulunmaktadır. Bu kesim noktalarından biri polimorfik baz değişimi içermediği için tüm bireylerde kesim gerçekleşmektedir. Diğer kesim noktası polimorfiktir. Enzim kesimi sonrası homozigot 4G/4G genotipli bireylerde 99 bp'lik tek bant, homozigot 5G/5G genotipli bireylerde 77 bp ve 23 bp'lik iki bant, heterozigot 4G/5G genotipli bireylerde ise 99 bp, 77 bp ve 23 bp'lik üç bant oluşacaktır.

3.4.17.2. Deneyin Yapılışı

1. 1,5 ml'lik ependorf tüpünün içine 15 µl PCR ürünü konuldu.
2. 18 µl son hacim içerisinde 10 U 1µl *Bs*I restriksiyon enzimi ve 1,8 µl 10X Buffer O tamponu (pH 7,4; 25 °C) eklendi.
3. 37 °C' de 16 saat kuru ısıtıcı blokta inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası tüplerin içine 5 µl Orange G jel yükleme boyası eklendi.
5. % 3'lük agaroz jelde moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 45 dakika 100 volt sabit akımda yürütüldü.

3.4.18. Döngüsel DNA Dizi Analizi Yöntemi ile İnsülin Reseptör (INSR) Geni Ekson 12 Polimorfizmlerinin Gösterilmesi

INSR geni ekson 12 ve bu eksondan sonra gelen intron bölgesindeki polimorfizmlerin gösterilmesi amacıyla hasta ve kontrol grubunun tümüne DNA dizi analizi tepkimesi uygulandı.

3.4.18.1. DNA Dizi Analizi Yapılacak Bölgenin PCR Yöntemi İle Çoğaltılması

Dizi analizi için INSR ekson 12 bölgesinde ve ardından gelen intronik bölgedeki polimorfizmi de içermek üzere 379 bç'lik bölge, aşağıda verilmiş olan primerler tasarlanarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı.

İleri 5'-TGATGGTGATGGTGTTCATCATA-3'

Geri 5'-TGTCCTTGGTCAGCCTTGATGT-3'

Dizi analizinde kullanılan PCR tepkime karışımı ve PCR programı sırayla Tablo 15 ve Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 15: Dizi analizinde kullanılan PCR tepkime karışımı

DNA 250 g/ml	10X PCR tamponu	Primerler 100pmol/ µl	MgCl ₂ (25mM)	dNTP (10mM)	Taq DNA polimeraz 5 U/µl	dH ₂ O	Toplam Hacim
2,5 µl	5 µl	0,5 µl	3 µl	0,5 µl	0,2 µl	38,3 µl	50 µl

Tablo 16: Dizi analizinde kullanılan PCR programı

Başlangıç denatürasyonu (1 döngü)	Tepkime Döngüsü (30 Döngü)			Son Sentez Aşaması (1 döngü)
	Denatürasyon aşaması	Hibridizasyon aşaması	Sentez (Uzama) aşaması	
94 °C'de 5 dk	94 °C'de 30 sn	60 °C'de 1 dk	72 °C'de 1 dk	72 °C'de 5 dk

3.4.18.2. DNA Dizi Analizi Yapılacak Bölgenin PCR Ürününün Saflaştırılması

Bölgeye ait PCR ürünü Invisorb Spin PCRapid Kit kullanılarak saflaştırıldı:

1. 2 ml'lik ependorf tüpüne filtre yerleştirdi.
2. PCR tüpüne 130 µl tampon fosfat eklendi. Karışım filtreye aktarılıp 1 dk bekletildi.
3. 30 sn 10.000 x rpm de santrifüj edildi. Çökelti kısmı atıldı.
4. 700 µl yıkama çözeltisi filtrenin üzerine eklenip, 30 sn 10.000 x rpm de santrifüj edildi.
5. Çökelti kısmı atıldı. Filtre aynı ependorf tüpüne tekrar yerleştirilip, 3 dk 14.000 x rpm de kalan yıkama çözeltisi uzaklaştırılması için santrifüj edildi.
6. Filtre yeni 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı. 20 µl örnek seyrelti çözeltisi filtreye yüklendi. 3 dk oda sıcaklığında bekletildi.
7. 1 dk 10.000 x rpm de santrifüj edildi. Filtre atıldı. Böylelikle çökeltideki PCR ürünü kontrol amaçlı saf halde elde edildi.

3.4.18.3. Saflaştırılan PCR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Analizi

Saflaştırılan PCR ürününün analizi agaroz jel elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi. % 2'lik agaroz jele örneklerden 5 µl yüklenerek PCR ürünü kontrol edildi.

3.4.18.4. Döngüsel DNA Dizi Analizi Tepkime Karışımı

INSR geni ekson 12 bölgesinin döngüsel dizi analizi tepkimesi BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ve ona ait protokol kullanılarak gerçekleştirildi. Bu tepkimeye kullanılan amplifikasyon karışımı Tablo17’de verilmiştir.

Tablo 17 : DNA dizi analizi amplifikasyon karışımı

H ₂ O	7,5	µl
Dizi analizi kit karışımı	8	µl
Primer F (10 pmol/µl)	0,5	µl
Saflaştırılmış PCR ürünü	4	µl

Isı 94 °C’ye geldikten sonra tüpler otomatik ısı döngü cihazına yerleştirildi. Başlangıç ayrılma işlemi için 95 °C’de 5 dk bir döngü bunu takiben aşağıda belirtilen program ayarlanarak 25 döngü olacak şekilde PCR tepkimesi gerçekleştirildi.

Ayrılma	95 °C’de	10 sn	} 25 döngü
Primer bağlanması	50 °C’de	5 sn	
Uzama	60 °C’de	4 dk	

Döngüler tamamlandıktan sonra, dizi sonrası saflaştırma işlemi aşağıda yazılı protokole göre yapıldı:

1. Döngüsel dizi analizi tepkimesi sonrası PCR tüpünün üzerine 2 µl (3mM pH: 4,6) NaAc’dan eklendi.
2. Üzerine 50 µl % 96’lık etil alkol eklendi.
3. Karışım 1,5 ml’lik ependorf tüpüne aktarıldı, hafifçe vurularak karıştırıldı.
4. Buz üzerinde 15 dk bekletildi.
5. Süre sonunda beklemeden 20 dk 13.000 x rpm de santrifüj edildi.
6. Üst kısım atıldı ve pelletin üzerine 250 ul %70’lik etil alkol eklendi ve yine elle hafifçe vurularak karıştırıldı.
7. 13.000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
8. Üstte kalan kısım pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
9. Geriye kalan çökelti oda ısısında kurumaya bırakıldı.

10. Üzerine 20 µl formamid eklenerek 0,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.
11. 94°C'de denatürasyon işlemi yapıldıktan sonra -20°C'de 2 dk bekletildi.

Tüpler otomatik DNA dizi analizi sistemine yerleştirilerek örnekler okutularak analiz edildi.

3.5. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Calpain 10 geni SNP -44, -43, -19 ve -63 polimorfizmleri, Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 geni promotor bölgede 4G/5G polimorfizmi, İnsülin Reseptör geni ekson 17 C/T polimorfizmi ve İnsülin Reseptör geni ekson 12'de bulunan rs16994210 C>T, rs35045353 C>T, rs2229434 G>A, rs2162771 C>T, rs1541806 C>T, rs2229430 G>C ve bu eksondan sonra gelen intron bölgesinde rs13306451 A>G şeklinde polimorfizmlerin kontrol ve hasta gruplarındaki genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluğu Ki-Kare (χ^2) testi ile araştırıldı. Her üç gene ait elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde "SPSS 15.0 for windows" paket programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama +/- standart sapma biçiminde ifade edildi. Kategorik değişkenler ise % şeklinde gösterildi. Kategorik karşılaştırmalar için Ki-Kare (χ^2) veya Fisher'in Kesin testi kullanıldı. Referans kategorilerine göre hasta ve kontrol grupları arasında hem genotip hem de allel bazında Olasılıklar Oranı ve % 95 güven aralıkları (GA) hesaplandı. P<0.05 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hasta ve kontrol grubunda, gözlenen genotiplerden expectation-maximization algoritmi (EM) ile tahmini haplotip sıklıkları Arlequin (version 3.1) ve SNPStats programları ile hesaplandı. Referans haplotipe göre hasta ve kontrol grubu arasında olasılıklar oranı ve % 95 güven aralıkları (GA) belirlendi.

4. BULGULAR

4.1 Klinik Bulgular

Çalışmamıza dahil edilen PKOS olgularının klinik ve laboratuvar özellikleri, G.Ü.T.F. Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Endokrinoloji Bilim Dalı tarafından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeden elde edilen 48 PKOS'lu hastalara ait bulgular, kontrol grubunun bilgileriyle birlikte Tablo 18'de verilmiştir.

Tablo 18: PKOS hastalarına ait bulgular ve kontrol grubunun bilgileri

	Kontrol	Hasta		P
		Obez PKOS	Normal PKOS	
n (birey sayısı)	50	29	19	
Yaş	15.5 ± 1.3	15.3 ± 1.1	15.1 ± 0,8	P>0.05
Kilo (kg)	53,8 ± 5.2	73.7 ± 6.9	55.8 ± 5.9	P ₁ <0.05
Boy (m)	1.59 ± 4.7	1.57 ± 4.2	1.60 ± 4.8	P>0.05
VKİ (kg/m²)	21.2 ± 2.2	28.6 ± 2.2	22.1 ± 2.1	P ₂ <0.05
Kıllanma puanı	-	14.6 ± 5.7	13.2 ± 4.1	P ₃ <0.05

P₁<0.05; Obez PKOS'ların ağırlığı normal PKOS ve kontrol grubuna göre

P₂<0.05; Obez PKOS'ların VKİ değeri normal PKOS ve kontrol grubuna göre

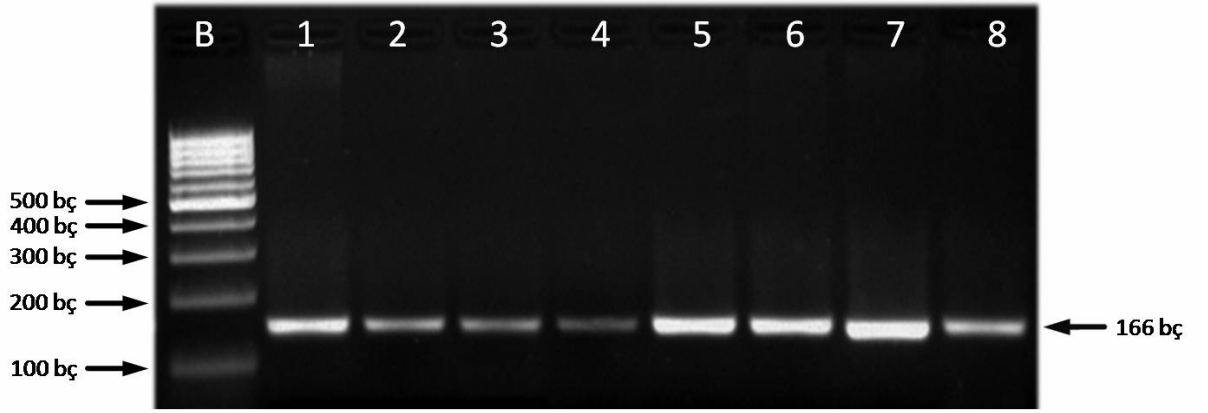
P₃<0.05; Obez ve normal PKOS olguların kıllanma skoru kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir.

Çalışmamıza alınan tüm bireylerin, boy ve ağırlık verilerine göre vücut kitle indeksi (VKİ) hesaplandı. Hastalar, VKİ persantillerine göre normal ve obez olmak üzere iki gruba ayrıldı.

4.2. Moleküler Genetik Analiz Bulguları

4.2.1. Calpain 10 Geni SNP -44 Bölgesi PCR ve Enzim Kesim Sonuçları

PCR'ı yapılan 48 hasta ve 50 sağlıklı kontrole ait ürünler % 2'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirildi. 166 bç'lik uzunluğa karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırıldı (Şekil 13).

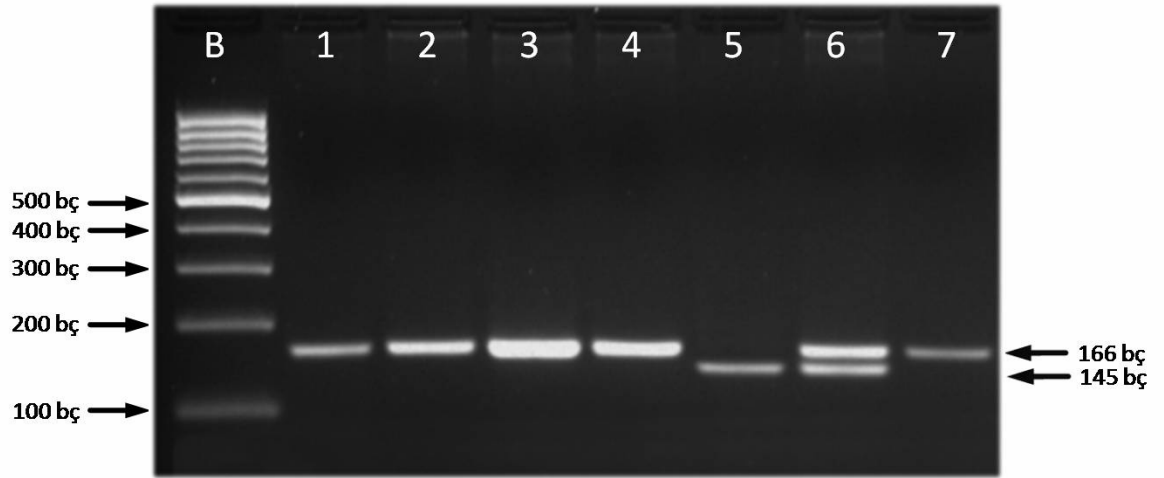


Şekil 13: Calpain 10 SNP -44 bölgesi PCR sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 no'lu kuyular: PCR ürünleri

Hastalara ve sağlıklı kontrollere ait PCR ürünleri, *Bst*FNI restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonrası ürünler % 3'lük agaroz jelde yürütüldü.

*Bst*FNI, *Bacillus stearothermophilus* türünden elde edilen bir restriksiyon enzimidir. *Bst*FNI çift zincirli DNA'yı 5'-CG↓CG-3' tanıma bölgesinden tanıyarak kesim yapar. PCR tepkimesi sonrası 166 bç'lik PCR

ürünü *Bst*FNI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Dolayısı ile enzim kesiminden sonra TT genotipli bireylerde 166 bç'lik tek bant, CC genotipli bireylerde 145 ve 21 bç'lik iki bant, heterozigot TC genotipli bireylerde ise 166, 145 ve 21 bç olmak üzere üç bant oluşur. 21 bç'lik bant agaroz jelde görülemediği için değerlendirme 166 ve 145 bç'lik bantların varlığına göre yapılmıştır. *Bst*FNI kesimine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 14'de gösterilmiştir.



Şekil 14: *Bst*FNI enzimle kesim sonuçlarının % 3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci; 1, 2, 3, 4: TT genotipli homozigot bireyler ; 6 : TC genotipli heterozigot bireyler ; 5: CC genotipli homozigot birey; 7: Kesilmemiş PCR ürünü

Calpain 10 SNP -44 bölgesine ait sonuçlar istatistiksel olarak Hardy-Weinberg ve Pearson's çift yönlü Ki-Kare (χ^2) testine göre değerlendirilmiştir. Öncelikle, CAPN 10 SNP 44 polimorfizmi hasta ve kontrol grubuna ait verilerinin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluğu araştırıldığında tüm grupların Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu bulunmuştur. İkinci olarak, bu genin polimorfik dağılımları hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. CAPN 10 SNP 44 bölgesindeki T/C değişimi incelendiğinde, hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımları Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 19: Calpain 10 SNP 44 bölgesi T/C değişiminin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel dağılımları.

SNP44	Kontrol (n=50)	Hasta (n=48)	OO(95% GA)	P değeri
TT	34 (% 68)	35 (% 72.9)	1.00 ^a	
TC	15 (% 30)	13 (% 27.1)	0.84 (0.35-2.03)	0.701
CC	1 (% 2)	0 (% 0)	Hesaplanamadı	-
TC+CC	16 (% 32)	13 (% 27.1)	0.79 (0.33-1.89)	0.594
Alleller				
T	83 (% 83)	83 (% 86.5)	1.00 ^a	
C	17 (% 17)	13 (% 13.5)	0.77 (0.35-1.67)	0.501

OO: Olasılık Oranı; GA: Güven Aralığı; a: Referans genotip/allel

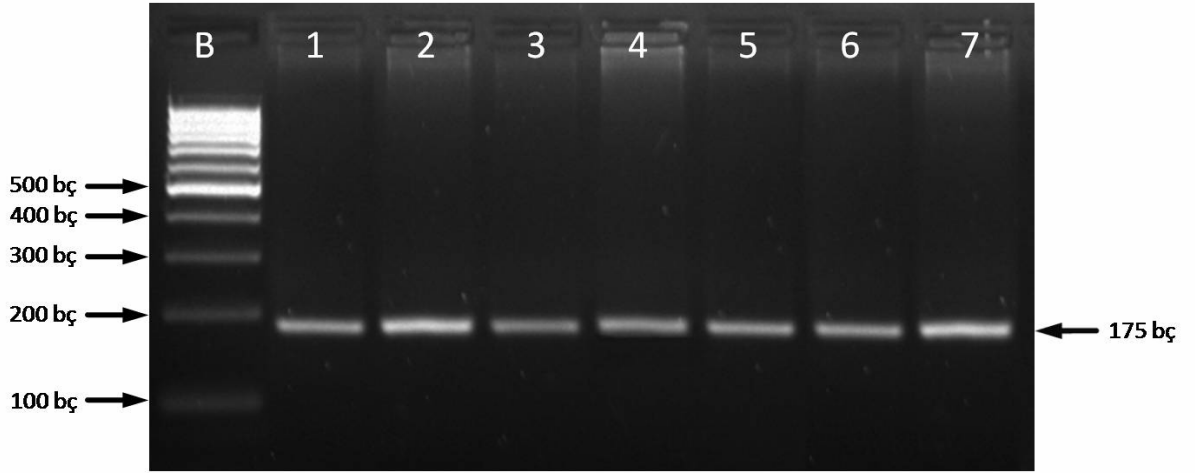
T: Timin; C: Sitozin

Çalışmamıza dahil edilen 48 PKOS'lu hastanın % 72.9'u TT, % 27.1'i TC genotip dağılımı göstermiştir. Kontrol grubunun ise % 68'i TT, % 30'u TC ve % 2'si CC genotip dağılımı göstermiştir.

Hasta grubunda T alleli görölme sıklığı % 86.5, C alleli görölme sıklığı % 13.5'dir. Kontrol grubunda ise T allelinin % 83, C allelinin ise % 17 olduğu belirlenmiştir. Allel dağılımları bakımından hasta ve kontrol grubu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p: 0.501).

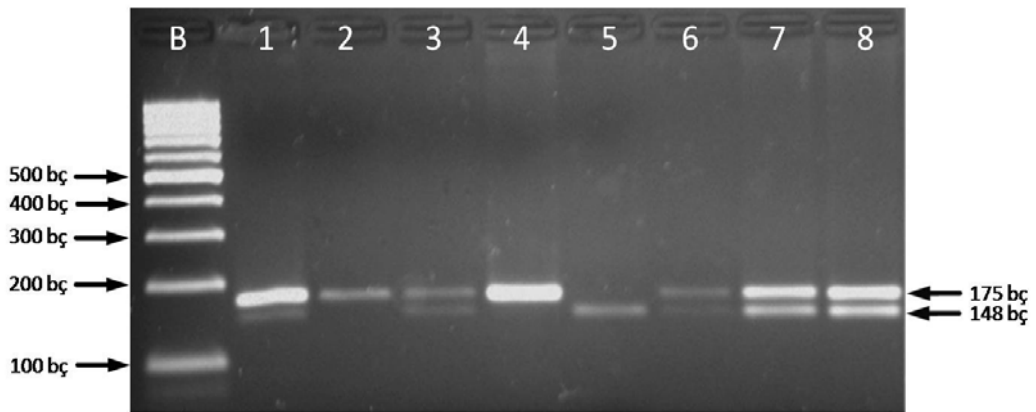
4.2.2 Calpain 10 SNP -43 bölgesi G/A PCR ve Enzim Kesim Sonuçları

PCR'ı yapılan 48 hasta ve 50 sağlıklı kontrole ait ürünler % 2'lik agaroz jelde yürütölerek değerlendirildi. 175 bç'lik uzunluğuna karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırıldı (Şekil 15).



Şekil 15: Calpain 10 SNP -43 bölgesinin PCR sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 no'lu kuyular: PCR ürünleri

Hastalara ve sağlıklı kontrollere ait PCR ürünleri *FauNDI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonrası ürünler % 3'lük agaroz jelde yürütüldü. Enzimle kesim sonrası homozigot GG genotipli bireylerde 175 bç'lik tek bant, GA genotipli heterozigot bireylerde 175, 148 ve 27 bç'lik üç bant, AA genotipli homozigot bireylerde 148 ve 27 bç'lik iki bant oluşur. 27 bç'lik bant agaroz jelde görülemediği için değerlendirme 175 ve 148 bç'lik bantların varlığına göre yapılmıştır (Şekil 16).



Şekil 16: *FauNDI* enzimle kesim sonuçlarının % 3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 2: Kesim yapılmamış PCR ürünü; 1, 3, 6, 7 ve 8: GA genotipli heterozigot bireyler ; 4: GG genotipli homozigot bireyler 5: AA genotipli homozigot birey

Calpain 10 SNP -43 gen bölgesine ait sonuçlar istatistiksel olarak Hardy-Weinberg ve Fischer's exact testine göre değerlendirilmiştir (Kontrol grubunda AA genotipli sadece bir olgu ve hasta gruplarında AA genotipli iki olgu olduğundan dolayı χ^2 testi uygulanamadı). Öncelikle CAPN 10 SNP -43 (G/A) değişiminin, hasta ve kontrol grubuna ait verileri Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluğu araştırıldığında tüm grupların Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu bulunmuştur. İkinci olarak, bu genin polimorfik dağılımları hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Calpain 10 SNP -43 G/A değişiminin hasta ve kontrol grubundaki genotip ve allel dağılımları Tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 20: Calpain 10 SNP 43 bölgesi G/A değişiminin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel dağılımları

SNP43	Kontrol (n=50)	Hasta (n=48)	OO(95% GA)	P değeri
GG	33 (% 66)	33 (% 68.8)	1.00 ^a	
GA	16 (% 32)	13 (% 27.1)	0.81 (0.34-1.96)	0.642
AA	1 (% 2)	2 (% 4.2)	2.0 (0.17-23.14)	1
GA+AA	17 (% 34)	15 (% 31.2)	0.88 (0.38-2.06)	0.772
Alleller				
G	82(%82)	79 (% 82.3)	1.00 ^a	
A	18(%18)	17 (% 17.7)	0.75 (0.35-1.63)	0.467

OO: Olasılık Oranı; GA: Güven Aralığı; a: Referans genotip/allel

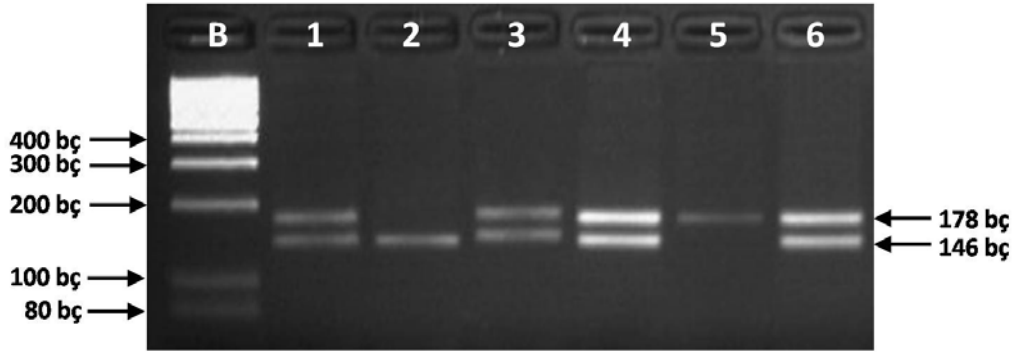
G: Guanin; A: Adenin

Çalışmamıza dahil edilen 48 PKOS'lu hastanın % 68.8'i GG, % 27.1'i GA ve % 4.2'si AA genotip dağılımı göstermiştir. Kontrol grubunun ise % 66'sı GG, % 32'si GA ve % 2'si AA genotip dağılımı göstermiştir.

Hasta grubunda G alleli görülme sıklığı % 82.3 A alleli görülme sıklığı % 17.7'dir. Kontrol grubunda ise G alleli % 82 oranında, A alleli ise % 18 oranında saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubunun allel dağılımları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0.467$).

4.2.3. Calpain 10 SNP -19 bölgesi PCR Sonuçları

PCR'ı yapılan 48 hasta ve 50 sağlıklı kontrole ait ürünler % 2'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirildi. 32 bç'lik uzunluğuna karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırıldı (Şekil 17).



Şekil 17: Calpain 10 SNP -19 bölgesi PCR sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 1, 3, 4 ve 6 : Heterozigot (146/178) genotip. 2: 146/146 homozigot genotip ve 5 : 178/178 homozigot genotip.

32 bç'lik insersiyon/delesyon nedeni ile ortaya çıkan SNP -19 polimorfizmin genotiplendirmesi doğrudan PCR sonrasında gerçekleştirilen agaroz jel elektroforezi yöntemi ile yapılmıştır. İnsersiyon taşıyan alel jelde 178 bç, delesyon taşıyan alel ise 146 bç olarak gözükmemektedir.

Calpain 10 SNP -19 bölgesine ait sonuçlar istatistiksel olarak Hardy-Weinberg ve Pearson's çift yönlü Ki-Kare (χ^2) testine göre değerlendirilmiştir. Öncelikle SNP -19 polimorfizmi hasta ve kontrol grubuna ait verilerinin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluğu araştırıldığında tüm grupların Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu bulunmuştur. İkinci olarak, bu genin polimorfik dağılımları bakımından hasta ve kontrol grubu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır. SNP -19 polimorfizmi hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımları Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 21: Calpain 10 SNP -19 bölgesine ait 32 bç'lik ins/del değişiminin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel dağılımları.

SNP19	Kontrol (n=50)	Hasta (n=48)	OO(95% GA)	P değeri
178/178	16 (% 32)	10 (% 20.8)	1.00 ^a	
146/178	24 (% 48)	31 (% 64.6)	2.08 (0.8-5.4)	0.132
146/146	10 (% 20)	7 (% 14.6)	1.12 (0.32-3.9)	0.859
146/178+146/146	34 (% 68)	38 (% 79.1)	1.79 (0.72-4.47)	0.211
Alleller				
178	56 (% 56)	51 (% 53.1)	1.00 ^a	
146	44 (% 44)	45 (% 46.9)	1.12 (0.64-1.97)	0.686

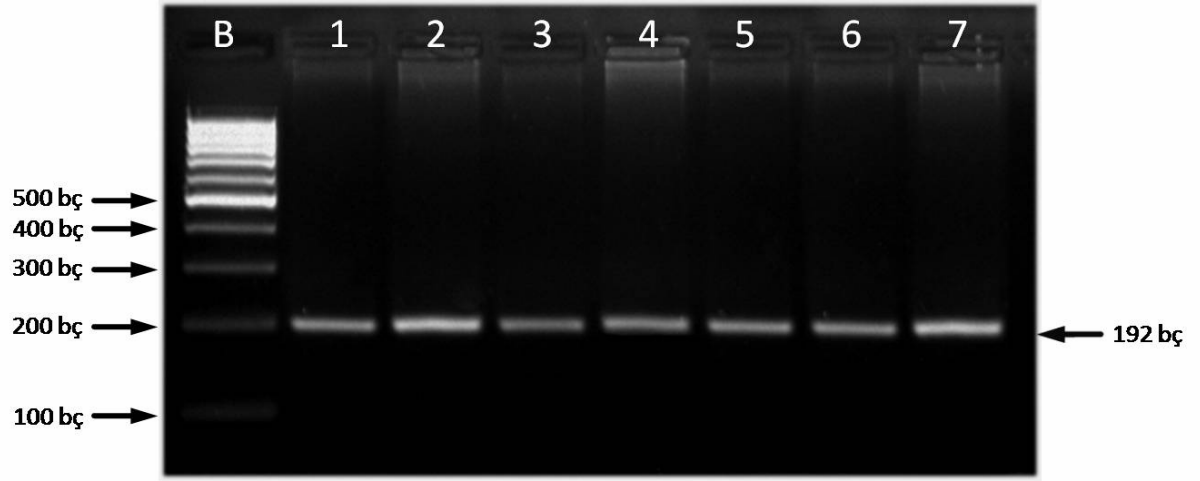
OO: Olasılık Oranı; GA: Güven Aralığı; a: Referans genotip/allel

Çalışmamıza dahil edilen 48 PKOS'lu hastanın % 20.8'i 178/178, % 64.6'sı 146/178 ve % 14.6'sı 146/146 genotip dağılımı göstermiştir. Kontrol grubunun ise % 32'si 178/178, % 48'i 146/178 ve % 20'si 146/146 genotip dağılımı göstermiştir.

Hasta grubunda 178 bç alleli görülme sıklığı % 53.1, 146 bç alleli görülme sıklığı % 46.9'dur. Kontrol grubunda ise 178 bç allelinin % 56 oranında, 146 bç allelinin ise % 44 oranında olduğu saptanmıştır (Tablo 19). Hasta ve kontrol grubunun allel dağılımları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p: 0.686).

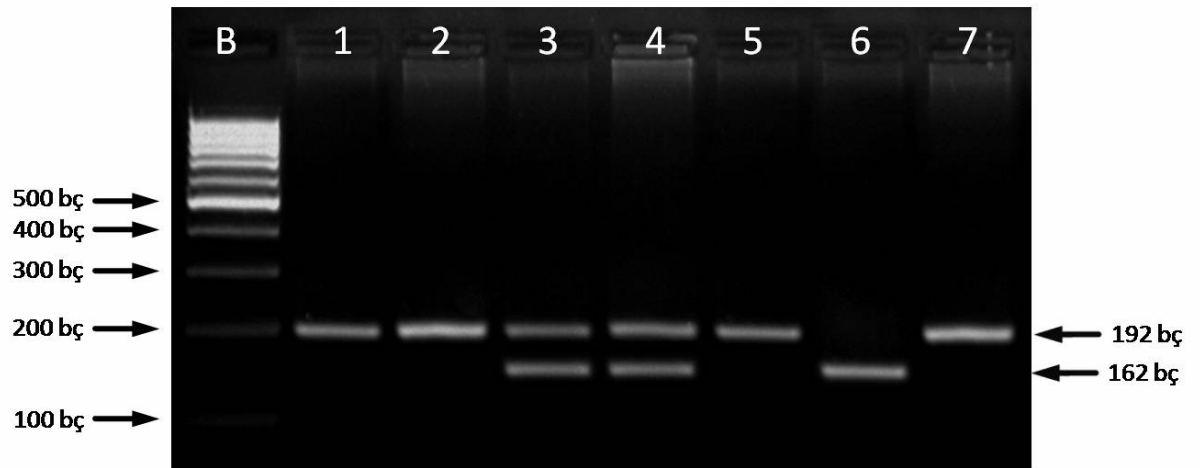
4.2.4 Calpain 10 SNP -63 bölgesi C/T PCR ve Enzim Kesim Sonuçları

PCR'ı yapılan 48 hasta ve 50 sağlıklı kontrole ait ürünler % 2'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirildi. 192 bç'lik uzunluğuna karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırıldı (Şekil 18).



Şekil 18: Calpain 10 SNP -63 bölgesi 192 bç'lik tekrar bölgesi PCR sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 no'lu kuyular: PCR ürünleri

Hastalara ve sağlıklı kontrollere ait PCR ürünleri *HhaI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonrası ürünler % 3'lük agaroz jelde yürütüldü. Enzimle kesim sonrası TT genotipli homozigot bireylerde 192 bç'lik tek bant, TC genotipli heterozigot bireylerde 192, 162 ve 30 bç'lik üç bant, CC genotipli homozigot bireylerde 162 ve 30 bç'lik iki bant oluşur. 30 bç'lik bant agaroz jelde görülemediği için değerlendirme 192 ve 160 bç'lik bantların varlığına göre yapılmıştır (Şekil 19).



Şekil 19: *HhaI* enzimle kesim sonuçlarının %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 1: Kesilmemiş PCR ürünü; 2, 5, 7: TT genotipli homozigot birey; 3 ve 4: CT genotipli heterozigot birey; 6: CC genotipli homozigot birey

Calpain 10 SNP -63 gen bölgesine ait sonuçlar istatistiksel olarak Hardy-Weinberg ve Fischer's exact testine göre değerlendirilmiştir (Kontrol ve hasta gruplarında TT genotipli hiç olgu olmadığından dolayı χ^2 testi uygulanamadı). Öncelikle CAPN 10 SNP -63 (C/T) değişiminin, hasta ve kontrol grubuna ait verileri Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluğu araştırıldığında tüm grupların Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu bulunmuştur. İkinci olarak, bu genin polimorfik dağılımları hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Calpain 10 SNP -63 G/A değişiminin hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımları Tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 22: CAPN 10 SNP -63 bölgesi C/T değişiminin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel dağılımları

SNP63	Kontrol (n=50)	Hasta (n=48)	OO(95% GA)	P değeri
CC	36 (%72)	39 (%81.3)	1.00 ^a	
CT	14 (%28)	9 (%18.7)	0.60 (0.23-1.54)	0.280
TT	0	0	Hesaplanamadı	-
Alleller				
C	86 (%86)	87 (%90.6)	1.00 ^a	
T	14 (%14)	9 (%9.4)	0.64 (0.26-1.55)	0.315

OO: Olasılık Oranı; GA: Güven Aralığı; a: Referans genotip/allel

C: Sitozin; T: Timin

Çalışmamıza dahil edilen 48 PKOS'lu hastanın % 81.3'ü CC, % 18.7 'si CT genotip dağılımı göstermiştir. Kontrol grubunun ise % 72'si CC, % 28'i CT genotip dağılımı göstermiştir.

Hasta grubunda C alleli görülme sıklığı % 90.6, T alleli görülme sıklığı % 9.4'dür. Kontrol grubunda ise C alleli % 86 oranında, T alleli ise %14 oranında saptanmıştır (Tablo 22). Hasta ve kontrol grubunun allel dağılımları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0.315$).

Calpain 10 geninde araştırılan SNP'lerin (-44, -43, -19, -63) oluşturduğu haplotiplerin kontrol ve hasta grubundaki tahmini sıklığı hesaplanmıştır (Tablo 23). Haplotiplerin dağılımı hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$).

Tablo 23: Calpain 10 geninde yer alan SNP -44,SNP -43, SNP -19 ve SNP -63 için haplotiplerin hasta ve kontrol grubundaki dağılımı.

<u>Haplotip</u>				<u>Kontrol</u>		<u>Hasta</u>		OO(%95 GA)	p
-44	-43	-19	-63	Sıklık	2n=100	Sıklık	2n=96		
1	1	2	1	0.3787	36	0.3542	35	1	
1	1	1	1	0.1669	16	0.2396	24	1.54(0.70-3.38)	0.278
1	2	2	1	0.1535	15	0.1771	18	1.23(0.54-2.83)	0.618
2	1	1	1	0.1447	14	0.1354	14	1.03(0.43-2.47)	0.950
1	1	1	2	0.1033	10	0.0938	9	0.93(0.37-2.55)	0.881
2	1	2	1	0.0161	2	-			
1	2	1	2	0.0148	1	-			
1	2	2	2	0.0117	1	-			
2	1	2	2	0.0102	1	-			

OO: Olasılık Oranı; GA: Güven Aralığı; a: Referans genotip/alel

SNP 44 için alel 1: T

alel 2: C

SNP 43 için alel 1: G

alel 2: A

SNP 19 için alel 1: 146

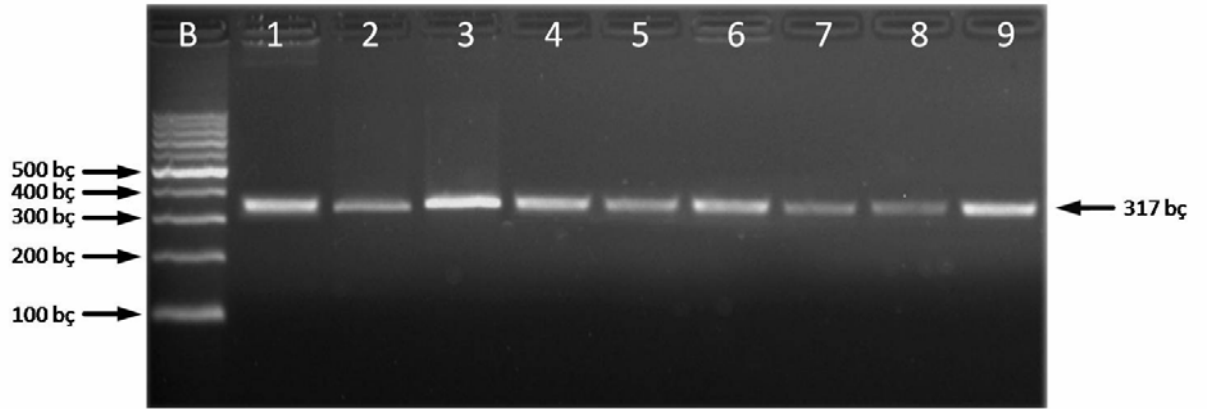
alel 2: 178

SNP 63 için alel 1: C

alel 2: T

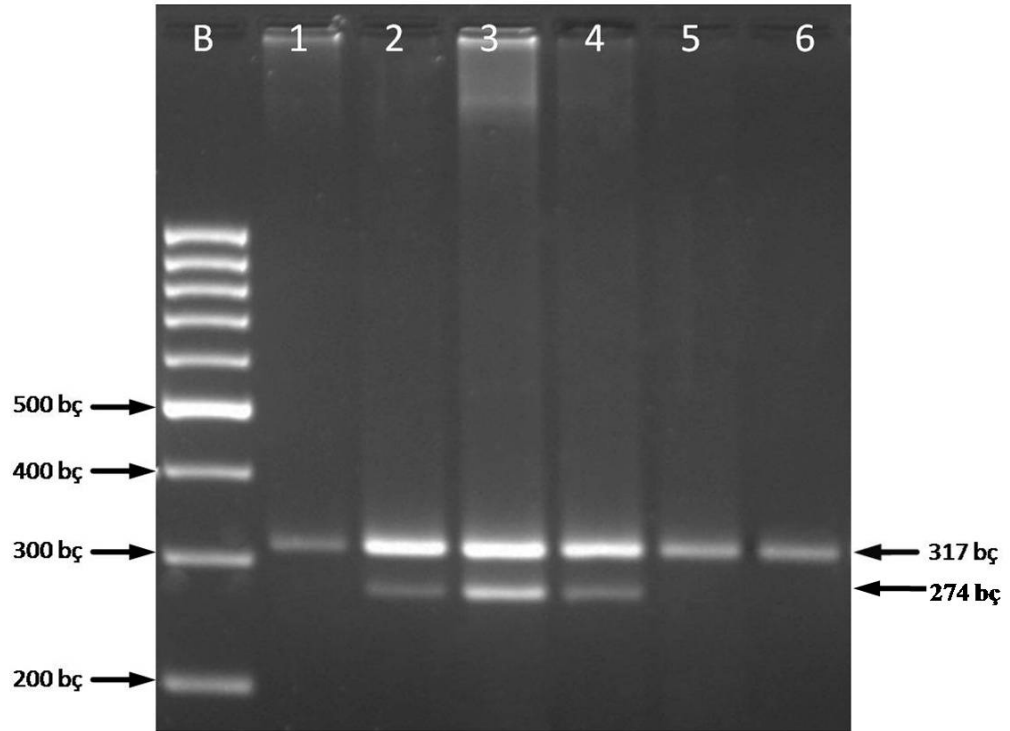
4.2.5. İnsülin Reseptör Geni Ekson 17 C/T Polimorfik Bölgesi PCR ve Enzim Kesim Sonuçları

PCR'ı yapılan 48 hasta ve 50 sağlıklı kontrole ait ürünler % 2'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirildi. 317 bç'lik uzunluğa karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırıldı (Şekil 20).



Şekil 20: INSR Geni Ekson 17 C/T 317 bç'lik tekrar bölgesi PCR sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 no'lu kuyular: PCR ürünleri

Hastalara ve sağlıklı kontrollere ait PCR ürünleri *Pml* restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonrası ürünler % 3'lük agaroz jelde yürütüldü. Enzimle kesim sonrası TT genotipli homozigot bireylerde 317 bç'lik tek bant, TC genotipli heterozigot bireylerde 317, 274 ve 43 bç'lik üç bant, CC genotipli homozigot bireylerde 274 ve 43 bç'lik iki bant oluşur. 43 bç'lik bant agaroz jelde görülemediği için değerlendirme 317 ve 274 bç'lik bantların varlığına göre yapılmıştır (Şekil 21).



Şekil 21: *PmlI* enzimle kesim sonuçlarının % 3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. B: 200 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 1: Kesilmemiş PCR ürünü; 5 ve 6 : TT genotipli homozigot; 2, 3 ve 4: CT genotipli heterozigot birey.

INSR geni ekson 17 bölgesine ait sonuçlar istatistiksel olarak Hardy-Weinberg ve Fischer's exact testine göre değerlendirilmiştir (Kontrol ve hasta gruplarında CC genotipli hiç olgu olmadığından dolayı χ^2 testi uygulanamadı). Öncelikle INSR ekson 17 (C/T) değişiminin, hasta ve kontrol grubuna ait verileri Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluğu araştırıldığında tüm grupların Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu bulunmuştur. İkinci olarak, bu genin polimorfik dağılımları hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). INSR geni ekson 17'deki C/T değişiminin hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımları Tablo 24'de verilmiştir.

Tablo 24: INSR geni ekson 17 bölgesi C/T değişiminin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel dağılımları

INSR geni ekson 17 C/T	Kontrol (n=50)	Hasta (n=48)	OO(95% GA)	P değeri
TT	21 (%42)	23 (% 47.9)	1.00 ^a	
CT	29 (%58)	25 (% 52.1)	0.79 (0.36-1.75)	0.556
CC	0	0	Hesaplanamadı	-
Alleller				
T	71 (% 71)	71 (% 74)	1.00 ^a	
C	29 (% 29)	25 (% 26)	0.86 (0.46-1.79)	0.643

OO: Olasılık Oranı; GA: Güven Aralığı; a: Referans genotip/allel

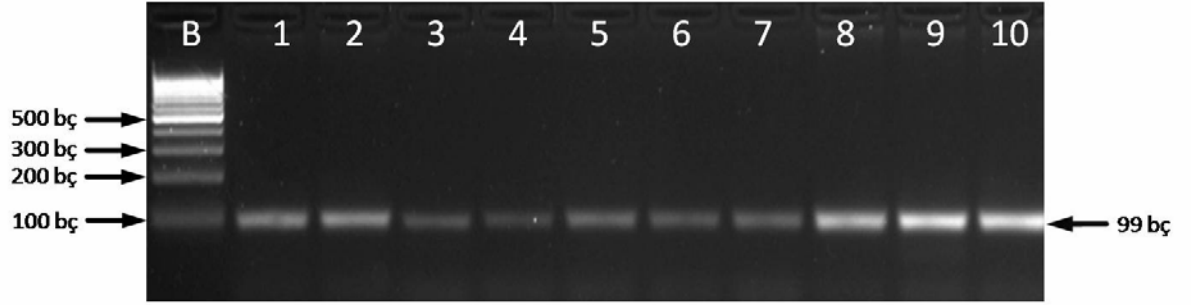
T: Timin; C: Sitozin

Çalışmamıza dahil edilen 48 PKOS'lu hastanın % 47.9'u TT, % 52.1'i CT genotip dağılımı göstermiştir. Kontrol grubunun ise % 42'si TT, % 58'i CT genotip dağılımı göstermiştir.

Hasta grubunda T alleli görülme sıklığı % 74, C alleli görülme sıklığı % 26'dır. Kontrol grubunda ise T alleli % 71 oranında, C alleli ise %19 oranında saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubunun allel dağılımları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p: 0.643). Ayrıca, PKOS'lu olgular obez ve normal PKOS olarak değerlendirildiğinde de iki grup arasında anlamlı bir istatistiksel fark bulunamamıştır (p>0.05).

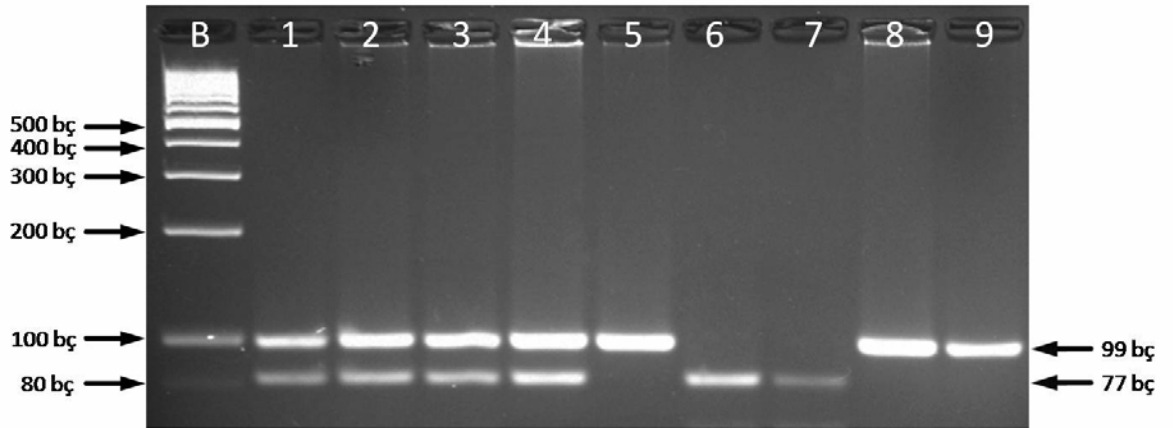
4.2.6. PAI 1 Geni Promotor 4G/5G Polimorfik Bölgesi PCR ve Enzim Kesim Sonuçları

PCR'ı yapılan 48 hasta ve 50 sağlıklı kontrole ait ürünler % 2'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirildi. 99 bp'lik uzunluğuna karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırıldı (Şekil 22).



Şekil 22: PAI 1 Geni Promotor 4G/5G 99 bç'lik bölgenin PCR sonuçlarının % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. B: 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 no'lu kuyular: PCR ürünleri

Hastalara ve sağlıklı kontrollere ait PCR ürünleri *BsI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonrası ürünler % 3'lük agaroz jelde yürütüldü. Enzimle kesim sonrası 4G4G genotipli homozigot bireylerde 99 bç'lik tek bant, 4G5G genotipli heterozigot bireylerde 99, 77 ve 23 bç'lik üç bant, 5G5G homozigot bireylerde 77 ve 23 bç'lik iki bant oluşur. 23 bç'lik bant agaroz jelde görülemediği için değerlendirme 99 ve 77 bç'lik bantların varlığına göre yapılmıştır (Şekil 23).



Şekil 23: *BsI* enzimle kesim sonuçlarının % 3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. B: 80 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 9: Kesim yapılmamış PCR ürünü; 5 ve 8: 4G4G homozigot bireyler; 1, 2, 3 ve 4: Heterozigot bireyler (4G/5G genotip); 6 ve 7: 5G5G homozigot birey (5G/5G genotip)

PAI 1 geni promotor bölgesi 4G/5G polimorfizmine ait sonuçlar istatistiksel olarak Hardy-Weinberg ve Fischer's exact testine

göre değerlendirilmiştir. Öncelikle PAI 1 geni promotor bölgesi 4G/5G değişiminin, hasta ve kontrol grubuna ait verileri Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluğu araştırıldığında tüm grupların Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu bulunmuştur. İkinci olarak, bu genin polimorfik dağılımları hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). PAI 1 geni promotor bölgesi 4G/5G değişiminin hasta ve kontrol grubundaki genotip ve allel dağılımları Tablo-25'te verilmiştir.

Tablo 25: PAI 1 geni promotor bölgesi 4G/5G değişiminin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel dağılımları

PAI	Kontrol (n=50)	Hasta (n=48)	OO(95% GA)	P değeri
4G/4G	12 (% 24)	7 (% 14.6)	1.00 ^a	
4G/5G	26 (% 52)	27 (% 56.3)	1.78 (0.61-5.22)	0.291
5G/5G	12 (% 24)	14 (% 29.2)	2.00 (0.60-6.70)	0.259
4G/5G+5G/5G	38 (%76)	41 (% 85.4)	1.85 (0.66-5.19)	0.238
Alleller				
4G	50 (% 50)	41 (% 42.7)	1.00 ^a	
5G	50 (% 50)	55 (% 57.3)	1.34 (0.76-2.36)	0.306

OO: Olasılık Oranı; GA: Güven Aralığı; a: Referans genotip/allel

Çalışmamıza dahil edilen 48 PKOS'lu hastanın % 14.6'sı 4G/4G, %56.3'ü 4G/5G ve % 29.2'si 5G/5G genotip dağılımı göstermiştir. Kontrol grubunun ise % 24'ü 4G/4G, % 52'si 4G/5G ve % 24'ü 5G/5G genotip dağılımı göstermiştir.

Hasta grubunda 4G alleli görülme sıklığı % 42.7, 5G alleli görülme sıklığı % 57.3'tür. Kontrol grubunda ise 4G alleli % 50 oranında, 5G alleli ise % 50 oranında saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubunun allel dağılımları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p: 0.306$).

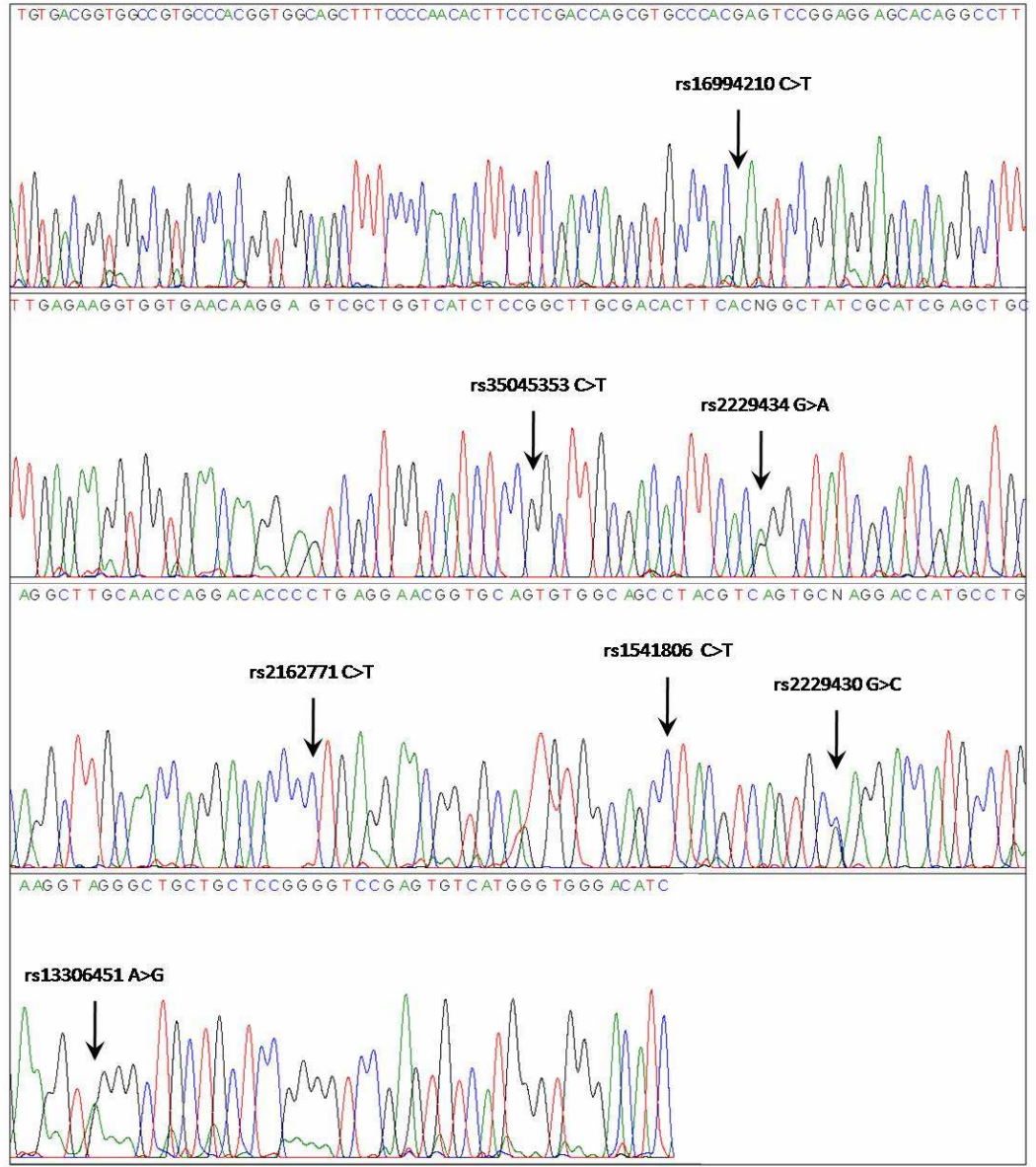
4.2.7. Döngüsel DNA Dizi Analizi

INSR geninin 12. eksonunda rs16994210 C>T, rs35045353 C>T, rs2229434 G>A, rs2162771 C>T, rs1541806 C>T, rs2229430 G>C ve bu eksondan sonra gelen intron bölgesinde rs13306451 A>G şeklinde tanımlanan yedi polimorfizm ile olası yeni mutasyonları belirlemek için döngüsel DNA dizi analizi yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla PCR'ı yapılan 48 hasta ve 50 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu genotiplendirilmiştir.

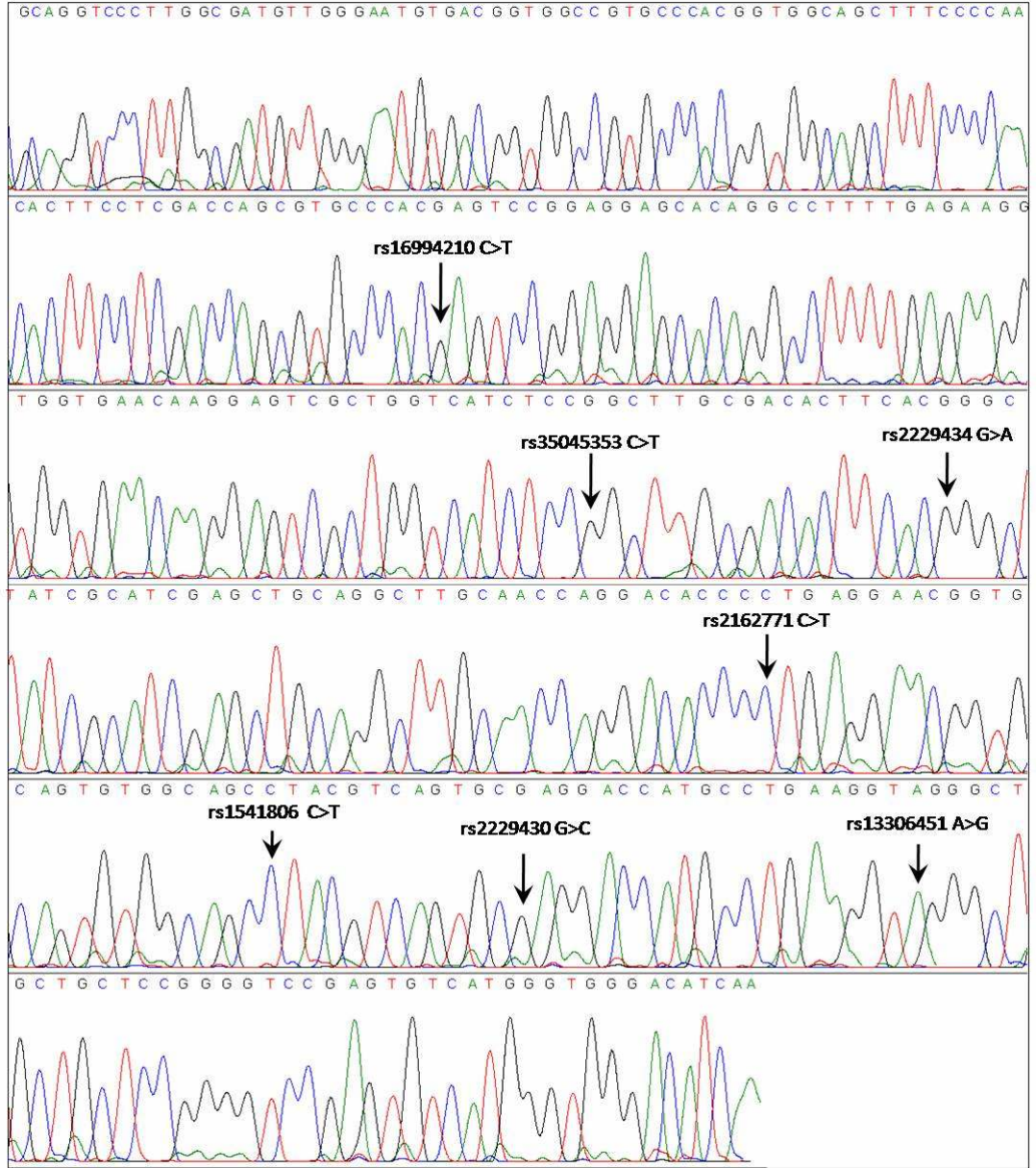
Hasta ve kontrol grubuna ait genotip ve alel dağılımları tablo 26'da verilmiştir. Bu yedi SNP DNA dizi analizi yapılan 48 hasta bireyden 2'sinde rs2229434 G>A pozisyonunda GA genotipi %4.2, kontrol grubundan 1 bireyde de aynı genotip % 2 sıklıkta bulunmuştur. rs2229430 G>C pozisyonunda GC genotipi 2 hastada %4.2 ve kontrol grubundan 1 bireyde de aynı genotip % 2 sıklıkta bulunmuştur. Bu değerlendirme sonucunda kontrol grubu ve hasta grupları arasında genotiplerin dağılımı ve alel dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir.

Bu tez çalışmasında, 48 PKOS hastası ve 50 sağlıklı bireye ait verilerin, Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$). $p<0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bu polimorfizmleri içeren INSR geni ekson 12'ye ve sonrasındaki intronik bölgeye ait DNA dizi analizi görüntü örnekleri Şekil 24 ve Şekil 25'de verilmiştir.



Şekil 24: İnsülin reseptör geni ekson 12 ve ardındaki intron bölgesindeki rs16994210 C>T (CC), rs35045353 C>T (CC), rs2229434 G>A (GA), rs2162771 C>T (CC), rs1541806 C>T (CC), rs2229430 G>C (GC) ve rs13306451 A>G (AA) genotipli bireye ait DNA dizi analizi görüntüsü.



Şekil 25: İnsülin reseptör geni ekson 12 ve ardındaki intron bölgesindeki rs16994210 C>T (CC), rs35045353 C>T (CC), rs2229434 G>A (GG), rs2162771 C>T (CC), rs1541806 C>T (CC), rs2229430 G>C (GG) ve rs13306451 A>G (AA) genotipli bireye ait DNA dizi analizi görüntüsü.

Tablo 26: İnsülin reseptör geni ekson 12 DNA dizi analizi genotip ve alel dağılımları.

INSR ekson 12	Kontrol (n=50)	Hasta (n=48)	OO(95% GA)	P değeri
rs16994210 C>T				
CC	50 (% 100)	48 (% 100)		
CT	-	-		
TT	-	-		
Aleller				
C	100 (% 100)	96 (% 100)		
T	-	-		
rs35045353 C>T				
CC	50 (% 100)	48 (% 100)		
CT	-	-		
TT	-	-		
Aleller				
C	100 (% 100)	96 (% 100)		
T	-	-		
rs2229434 G>A				
GG	49 (% 98)	46 (%95.8)	1.00 ^a	
GA	1 (% 2)	2 (% 4.2)	2.13 (0.19-24.30)	0.613
AA	-	-		
Aleller				
G	99 (% 99)	94 (% 97.9)	1.00 ^a	
A	1 (% 1)	2 (% 2.1)	2.11 (0.19-23.62)	0.615
rs2162771 C>T				
CC	50 (%100)	48 (% 100)		
CT	-	-		
TT	-	-		
Aleller				
C	100 (% 100)	96(% 100)		
T	-	-		
rs1541806 C>T				
CC	50 (%100)	48(% 100)		
CT	-	-		
TT	-	-		
Aleller				
C	100 (% 100)	96(% 100)		
T	-	-		
rs2229430 G>C				
GG	49 (%98)	46 (%95.8)	1.00 ^a	
GC	1 (%2)	2 (%4.2)	2.13 (0.19-24.29)	0.613
CC	0	0	Hesaplanamadı	-
Aleller				
G	99 (%100)	93 (%96.9)	1.00 ^a	
C	1 (%100)	3 (%3.1)	3.19 (0.35-31.25)	0.361
rs13306451 A>G intronik				
AA	50 (%100)	48 (% 100)		
AG	-	-		
GG	-	-		
Aleller				
A	100 (%100)	96 (% 100)		
G	-	-		

OO: Olasılık Oranı; GA: Güven Aralığı; a: Referans genotip/alel

G: Guanin; A: Adenin; C: Sitozin; T: Timin

5- TARTIŞMA

PKOS, genetik ve çevresel faktörlerden etkilenen ve bireysel farklılıklardan dolayı heterojen görünüm sergileyen, kompleks bir sendromdur^{5,6}. Sendromun ilk belirtileri ergenlik döneminde ortaya çıkmaktadır. Ergen kızlarda, kıllanma artışı, akne, adet düzensizliği ve obezite bulguları bulunmaktadır. PKOS, erişkin bireylerde ise, tip 2 diabetes mellitus, hipertansiyon, kalp damar hastalıkları ve endokrin kökenli infertilitenin en sık nedeni olarak gösterilmektedir¹¹.

PKOS, genetik faktörlerin etkisiyle ortaya çıktığı için, sendromun temelinde rol oynayan (steroid hormon sentezi ve faaliyetinde yer alan, karbonhidrat metabolizması ve enerji homeostasisinde yer alan, gonadotropin faaliyetinde ve düzenlenmesinde yer alan ve insülin metabolizmasında yer alan) genlerdeki polimorfizmler, genetik temelin aydınlatılmasında önemli yer tutmaktadır⁷.

Bu tez çalışması, toplumumuzda PKOS'lu ergen kızlarda, PKOS ve Calpain 10, insülin reseptör ve plazminojen aktivatör inhibitör 1 geni polimorfik bölgelerinin genetik bağlantısının varlığı ve genetik yatkınlık açısından yapılan ilk araştırmadır.

Bu tez çalışmasında incelenen ilk gen bölgesine ait polimorfizm, Calpain 10 geni üzerinde bulunan SNP -44, -43, -19, -63' tür.

PKOS'ta Calpain 10 geni arasındaki bağlantıya dair ilk deliller İngiltere'de yapılan çalışmalarda ileri sürülmüştür. Bu çalışmalarda -44 aleli ile PKOS yatkınlığı arasında belirgin bir bağlantı olduğu önerilmiştir. Ancak, sonradan yapılan daha geniş kapsamlı çalışmalarda bu öneri doğrulanmamıştır⁷¹. Bir çalışmada, -43 ve 11 bç uzaklıktaki -44 polimorfizminin transkripsiyonel düzenlemede 'enhancer' benzeri element görevi üstlendikleri önerilmektedir^{73,84}.

Avrupa kökenli hasta ve kontrol grubundan oluşan bir çalışmada, Calpain 10 genine ait polimorfizmler ve PKOS ilişkisi araştırılmıştır. Calpain 10 geni ile PKOS arasında herhangi bir bağlantı kurulamadığı gösterilmiştir⁷⁴. Bu gen ile tip 2 diabetes mellitus arasındaki ilişkiden yola çıkılarak yapılan çalışmalardan -44, -43, -19, -63 polimorfizmlerinin tip 2 diabete yatkınlık sağladığı bilinmektedir. PKOS ve tip 2 diabetes mellitus arasındaki

fizyolojik ve epidemiyolojik benzerlikler, her iki hastalığın aynı etiyolojiyi paylaştığını önermektedir. Bazı araştırmalar bu ortak mekanizmaların bir bölümünün kalıtsal olduğunu göstermektedir^{75,76,77,78}. Calpain 10 geni regülasyonunun veya değişmiş fonksiyonunun tip 2 diabeti oluşturma mekanizması açık değildir. Ancak, bu proteazın normal insülin salınımında rolü olduğu yönünde öneriler vardır. Eğer bu öneriler doğrulanırsa, sonuç, bozulmuş Calpain 10 fonksiyonunun PKOS'a kıyasla tip 2 diabete yatkınlıkta daha etkin olduğu sonucu ile uyumlu olacaktır⁷⁴. Bu farklılık, her iki hastalık için gen faaliyetinin henüz açıklanamamış farklı mekanizmalarla düzenlenmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

Aynı araştırmada⁷⁴, Calpain 10 genindeki polimorfizmlerin tip 2 diabete yatkınlık bakımından Avrupalılarda, Meksika kökenli Amerikalılara kıyasla daha az etkili olduğu bildirilmiştir⁷⁴. Bunun nedenleri arasında, risk ilişkili haplotiplerin sıklığında etnik temele bağlı farklılıklar ve diğer lokuslarda modifiye edici genlerin varlığı tartışılabilir.

İspanyol popülasyonu üzerinde yapılan bir çalışmada, -44 aleli ile PKO fenotipi arasında bağlantı belirlenmiştir. Buna ek olarak, PKOS'lu hastalarda gözlemlenen –hiperkolesterolemi varlığı (haplotip 1121), hiperandrojenemi varlığı, ve ailede kanser sıklığı (haplotip 1111) gibi – fenotipik farklılıklar ile bazı Calpain 10 alelleri (-44, -43, -19, -63) arasında bağlantı olduğu görülmüştür⁷¹. Yine İspanya'da yapılan bir çalışmada, -44 alelinin PKOS ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Polimorfik C aleli hastalarda % 22.7, kontrol grubunda ise % 11.3 olarak bulunmuş ve PKOS'a yatkınlıkta Calpain 10 geninin rolü olduğu görüşü desteklenmiştir⁸². Ancak, bu tez çalışmasında, SNP -44 T/C değişimi yönünden hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık gösterilememiştir. Hastaların % 72.9'u TT, % 27.1'i TC genotip dağılımı gösterirken kontrol grubunda bu dağılım % 68 TT, % 30 TC ve % 2 CC genotipi şeklinde bulunmuştur ($p>0.05$)(Tablo 19).

Farklı etnik kökenden gelen Amerikalılar üzerinde yapılan bir çalışmada, Calpain 10 geni, -43, -19, -63 polimorfizmlerinin PKOS ile ilişkili olarak hormonal ve metabolik ölçümleri etkilemediği ileri sürülmüştür. Ancak, 112 /121 haplotip kombinasyonunun diğer haplotip kombinasyonları ile karşılaştırıldığında Afrika kökenli Amerikalı ve Beyazlarda PKOS'a yatkınlıkta iki kat daha fazla ilişkili olduğu bildirilmiştir⁸⁰. Bu tez çalışmasında, Calpain 10 genine ait haplotip analizinde, kombinasyonların hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık oluşturmadığı görülmüştür (Tablo 23).

Calpain 10 geni SNP -43 polimorfizmi Pima yerlilerinde tip 2 diabetes ile olan bağlantı yönünden çalışılmış, ancak bir ilişki gösterilememiştir. Ancak, -43'teki G aleli için homozigot olan normal glikoz toleransına sahip hastaların, A alelini taşıyan hastalara kıyasla, iskelet kaslarında daha düşük mRNA ifadenmesine^{72,83} ve daha fazla insülin direncine sahip oldukları bulunmuştur⁷⁹. Bu sonuç, G alelinin tip 2 diabetes gelişiminde rolü olduğu fikrini tartışmalı hale getirmektedir. Bu tez çalışmasında ise, yabancıl alel olan G aleli sıklığının, hasta grubunda % 82.3 olduğu ve kontrol grubu ile paralellik gösterdiği bulunmuştur.

Alman PKOS'lu hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, AA genotipi taşıyan kadınlarda GG genotipi taşıyan kadınlara kıyasla, -56 polimorfizmi ile PKOS'a yatkınlık arasında bağlantı bulunmuştur. Aynı çalışmada, -19 ile de ilişki gösterilmiştir⁸¹. Bu iki polimorfizm ile PKOS arasındaki ilişkinin temelinde transkripsiyonel süreçte oluşan modifikasyonlar önerilmektedir. -56, transkripsiyon esnasında, bağlayıcı veya etkileşim halindeki birimlerde değişime neden olmazken, -19'da 32 bç'lik tekrar dizileri pdx 1 (pankreatik ve intestinal homeodomain) transkripsiyon faktörünün (TF) olası bağlanma birimlerini içerir. -19'da, 32 bç'lik delesyon durumunda bu TF'nün iki olası bağlayıcı birimi varken, insersiyon durumunda üç bağlayıcı birim vardır. Pdx 1'in fare pankreası β hücrelerinin olgunlaşmasında rolü olduğu düşünülmektedir. PKOS ile diabetes arasındaki ilişki ve insülin duyarlılaştırıcı ilaçların olumlu etkisi göz önüne alındığında, -19 polimorfizminin pdx 1 TF aracılığıyla PKOS üzerinde risk yarattığı önerilmektedir⁸¹.

Bu tez çalışması sonucunda, Calpain 10 genine ait SNP -44, -43, -19 ve -63 polimorfizmleri için PKOS'lu olgular ve kontrol grubu arasında genotip ve alel dağılımları bakımından anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Elde edilen sonuçlara göre, bu polimorfizmlerin çalışma grubunda PKOS için genetik bir risk faktörü olarak belirlenemeyeceği düşünülmüştür. Ancak, seçilen polimorfik bölgeler dışında var olan diğer bölgelerin de çalışılması, bizim toplumumuz açısından yeni verilerin elde edilmesine olanak sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında incelenen ikinci gen bölgesine ait polimorfizm, INSR geninin 17. eksonunda (tirozin kinaz birimi) C/T değişimidir.

Konuya ilişkin ilk çalışmalarda, insülin direnci yüksek olan bazı PKOS hastalarında insülin reseptör geninin tirozin kinaz biriminde mutasyonlar gösterilmiştir^{85,86,87}. Ancak bunun tersini gösteren çalışmalar

da bildirilmektedir. PKOS'a genetik yatkınlıkta, insülin reseptöründeki mutasyonlardan ziyade, tek nükleotid polimorfizmlerinin veya genin ifadenmesini kontrol eden düzenleyici unsurların etkin olabileceği düşünülmektedir. Tek nükleotid polimorfizmleri insülin reseptörü fonksiyonunda ve/veya doku ifadenmesinde daha az önemli değişiklikleri indüklemektedir⁸⁸. Tucci ve arkadaşlarının çalışmasında, PKOS'lu hastalarda dört aday genin (follistatin, CYP 19, CYP17 ve insülin reseptörü) bağlantıları araştırılmıştır. Çalışma sonucunda sadece insülin reseptör geninin ilişkili olduğu görülmüştür⁸⁸.

Bir başka çalışmada, INSR geninin 17. eksonundaki bir tek nükleotid polimorfizmi ile PKOS arasında bağlantı bulunmuştur. Bu SNP, sadece zayıf hastalarda (VKİ 27 ve küçük olanlarda) görülmüştür. Siegel ve arkadaşları, zayıf PKOS'lu olguların % 47'sinde obez PKOS'luların ise %29'unda CT veTT genotip varlığını göstermişlerdir. Zayıf PKOS'lu grupta bulunan genotip sıklığı kontrol grubu ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur⁸⁹. Ancak bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlarda, çalışma grubunda hastalar vücut kitle indeksi yönünden obez ve normal PKOS olarak iki gruba ayrılmasına rağmen (Tablo 18), genotip dağılımları bakımından istatistiksel yönden anlamlı bir farklılık gösterilememiştir ($p>0.05$).

PKOS'lu obez olgularda ise, yüksek düzeyde insülin direnci geliştiği gösterilmiştir⁸⁹. Obezite, hiperandrojenemiye yatkınlık sağlamaktadır. Dolayısıyla, vücut kitle indeksi ile testosteron düzeyi ve aynı zamanda serbest androjen indeksi arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Çalışmanın sonucu, PKOS'un gelişiminde insülin direnci ve obezitenin doğrudan etkili olduğunu göstermektedir. Ancak, daha önce yapılan bazı çalışmalarda PKOS'taki insülin direncinin vücut ağırlığından bağımsız olduğu önerilmiştir. Burada INSR genindeki fonksiyonel değişimlerin zayıf ve obez PKOS'lularda insülin direncinin farklı mekanizmalarla oluşabileceği ve bunu aydınlatabilmek için daha geniş gruplar üzerinde çalışma yapılması gerektiği bildirilmektedir⁸⁹. Bizim çalışmamızda da, obez ve normal PKOS'lu olgular arasında TT ve CT genotip dağılımı açısından anlamlı bir farklılık gösterilememiştir ($p>0.05$).

Koreli PKOS olgularında yapılan 17. ekson C/T polimorfizm çalışmasında araştırmacılar, normal alel olarak tanımladıkları C alelinin sıklığını hasta grubunda kontrol grubuna göre hafifçe yüksek bulmuşlardır. Bu bulguya dayanarak, INSR geni 17. eksonda C/T polimorfizminin Kore popülasyonu için PKOS'a yatkınlık ile ilişkilendirilemediğini ifade etmişlerdir⁹⁰.

Jin ve arkadaşları, Çinli PKOS olgularında insülin direnci ve INSR β alt biriminin ifadenmesi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu çalışmada bizim çalışmamızdaki polimorfizmden farklı olarak Cys 1008 T/C polimorfizmini çalışmışlardır. PKOS'lu kadınlarda CC genotip sıklığının (% 21.1) kontrol grubuna (%5.6) göre anlamlı şekilde yüksek bulunduğunu göstermişlerdir. Yabani genotipe sahip kadınların aksine PKOS'lu kadınların daha düşük insülin duyarlılığı indeksine sahip oldukları ve Cys1008 T/C polimorfizmi ile azalmış insülin duyarlılığı arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, bu polimorfizm ile INSR β alt birimi ifadenmesi arasında ilişki gösterilememiştir⁹¹.

Bu tez çalışması sonucunda, insülin reseptör geni 17. eksonda C/T polimorfizmi açısından PKOS'lu olgular ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo24). Diğer çalışmalardan yola çıkarak, farklı populasyonlarda değişik sonuçlar elde edilmesi, bu değişimin çalışılan farklı etnik kökenli gruplardan kaynaklanabileceğini ve polimorfizmlerin farklı hastalıklar için farklı sonuçlar oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında incelenen üçüncü gen bölgesine ait polimorfizm, PAI 1 geninin promotor bölgesinde 4G/5G polimorfizmidir. PAI-1, maternal dokudan plasentanın ayrılması ve plaseenta gelişiminin erken evrelerinde fibrinolitik aktivitede temel rol oynamaktadır. Plazminojen aktivatör inhibitörleri plasental villus içi boşluklarda kan akımının sağlanmasında ve uterusun trofoblast invazyonunda önemli role sahiptir⁷⁰. PKOS'lu kadınlarda, yüksek düzey PAI-1 aktivitesinin yanı sıra PAI-1 geni 4G4G ve 4G5G genotiplerine yatkınlığın daha fazla olduğu bildirilmiştir. 4G4G genotipinin tekrarlayan gebelik kaybı olan PKOS'lu kadınlarda düşük için bağımsız risk faktörü olduğu gösterilmiştir⁷⁰.

PAI-1 aktivitesinin, 4G4G genotipi ile arasındaki ilişkinin yanı sıra vücut kitle indeksi ve bel kalça oranı ve insülin direnci ile de pozitif ilişki vardır. Bu yüksek düzey PAI-1 aktivitesinin aterotromboz gelişimi açısından önemi vardır⁶⁸. İnsülin düzeyinin düşürülmesi ile birlikte plazma PAI-1 aktivitesinin de azaldığı gözlenmiştir. İnsülin ve trigliserit düzeyi yüksek ve obezite ile uyumlu olarak düşüğe neden olan PAI-1 ifadenmesine yaygın olarak 4G alellerinin katkıda bulunduğu bilinmektedir. 4G4G genotipinin ciddi gebelik komplikasyonlarından düşüklerde bağımsız bir belirleyici olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir⁷⁰. Düşükle bağlantılı olduğu bilinen antifosfolipid antikorların PAI-1 aktivitesini güçlendirerek bu sonucun ortaya çıkmasında etkin olduğu

bildirilmektedir⁷⁰. Bir çalışmada ise, PKOS olmayan ancak tekrarlayan gebelik kaybı olan olgularda da PAI-1 aktivitesinin katkısı olduğuna dikkat çekmişlerdir⁹².

Bu gendeki polimorfizmlerle yapılan birçok çalışmada, PAI-1 polimorfizminin, *in vivo* ve *in vitro* sistemik PAI 1 seviyelerinin artışı ile ve gen transkripsiyonunun güçlenmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Walch ve arkadaşları, PAI 1 promotor bölgede 4G/5G polimorfizmi ve PKOS arasında bağlantı bulamamışlardır⁶⁹.

Normal adet döngüsü ve normal androjen hormon bulguları olan kadınlarla PKOS'lu kadınlar arasında yapılan araştırmada homozigot 4G4G ve heterozigot 4G5G genotipleri PKOS'lu kadınlarda anlamlı bulunmuştur. Bu grupta aynı zamanda plazma PAI-1 düzeylerinin de kontrol grubundan daha yüksek olduğu gösterilmiştir⁷⁰. 4G4G genotipi varlığının PAI-1 düzeylerini artırdığı ve artan PAI-1 düzeylerinin kardiovasküler hastalık ve trombojenik eğilim riskinde artışı da beraberinde getirdiği bildirilmektedir⁷⁰.

PAI-1 düzeyleri, ülkemizde obez çocuklarda yapılan bir araştırmada, zayıf çocuklara göre daha yüksek bulunmuştur. Bununla beraber, plazma PAI-1 düzeyleri ve PAI 1 geni 4G5G polimorfizmi arasındaki ilişki tartışmalıdır. Sıklık yüksek olmasına rağmen lipid ve glikoz parametreleri üzerindeki etki obez çocuklarda gözlenememiştir. Bulgular 4G5G promotor bölge polimorfizminden başka sitokinler, hormonlar gibi diğer faktörlerinde PAI-1 üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir⁹³.

Yunan popülasyonu üzerinde yapılan bir çalışmada, PAI 1 4G5G polimorfizmi ile PKOS arasında anlamlı bir ilişki gösterilmiştir. 4G4G genotipi hasta grubunda % 39.8 iken kontrol grubunda % 20.31 olarak, 4G5G genotipi hasta grubunda % 39.8 iken kontrol grubunda % 28.13 olarak bulunmuştur. Aynı gruplarda PAI 1 plazma düzeyleri de kontrol grubuna kıyasla anlamlı yüksek bulunmuştur⁹⁴. Bu bulgular PAI 1 geni promotor bölgesinde 4G alelinin varlığının PAI 1 düzeyinin artmasına neden olduğunu öne sürmektedir. Ayrıca, bu ilişki kardiyovasküler risk ve artmış tromboz eğilimine de işaret etmektedir^{95,96}.

PAI 1 4G5G polimorfizmi ile pozitif aile öyküsüne sahip prostat kanserli erkekler arasında yapılan bir çalışmada, prostat kanseri ile bu polimorfizm arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir. Ancak, ailede

prostat kanseri olan hastalarda, 4G/5G genotipine sahip bireylerde kontrol grubuna kıyasla anlamlı sonuç bildirilmiştir⁹⁷.

Sistemik meningokoksemlili (sepsis ve menenjit) çocuklarda PAI 1 geni 4G/5G polimorfizminin araştırıldığı bir çalışmada, menenjit ile bu polimorfizm arasında bir ilişki bulunamadığı, ancak, 4G aleli yönünden homozigot bireylerde bu enfeksiyonla zayıf bir korelasyon gösterildiği bildirilmiştir⁹⁸.

PAI 1 ifadenmesindeki farklılıklar, ateroskleroz, böbrek ve akciğer fibrozisi, insülin direncini içeren birçok hastalık ile ilişkili bulunmuştur⁹⁹. PAI 1, hücre adhezyonu ve göçündeki rolü nedeniyle, tümör şekillenmesi, tümör büyümesi ve metastazda da araştırılmıştır. Ülkemizde PKOS'lu kadınlar üzerinde yapılan bir çalışmada, genotip dağılımları ve alel sıklıkları bakımından anlamlı bir farklılık gösterilememiştir¹⁰⁰.

Çalışmamızın sonucunda ise, PAI 1 geni promotor bölgesinde 4G/5G polimorfizmi açısından PKOS'lu olgular ve kontrol olgular arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$). 4G alelinin sıklığı hasta grubunda % 42.7, kontrol grubunda ise, % 50 olarak bulunmuştur ($p>0.306$) (Tablo25). Bu çalışmanın sonuçlarına göre, PAI 1 geni promotor bölgedeki 4G/5G polimorfizminin, Türk toplumunda PKOS için genetik bir risk faktörü olarak belirlenemeyeceği düşünülebilir. Aynı polimorfik bölgenin farklı hasta gruplarında çalışılmasıyla elde edilen farklı sonuçlar, her hastalık için gen düzenleme ve ifadenme mekanizmalarının farklı olabileceğini düşündürmektedir. PKOS'lu olgular ile yapılan genetik çalışmalarda genotip ve haplotiplerin dağılımında etnik farklılıklar vardır. Bazı polimorfizmler sadece belirli popülasyonlarda bulunmakta, bazıları ise farklı alel sıklıkları göstermektedir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, Calpain 10 geni üç, altı ve onüçüncü intron bölgelerinde tanımlanan SNP - 44, - 43, -19, - 63 polimorfizmleri, insülin reseptör geninin 17. eksonunda C/T polimorfizmi ve plazminojen aktivatör inhibitör 1 geni promotor bölgede 4G5G polimorfizminin Türk toplumundaki alel ve genotip dağılımları ve sıklığı ile PKOS arasındaki ilişki araştırılmıştır. Ayrıca, insülin reseptör geninin 12. eksonunda DNA dizi analizi yapılarak olası polimorfizmler araştırılmıştır.

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar, Türk toplumunda üç farklı gene ait altı polimorfizm bakımından hasta bireyler ve kontrol grubu arasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir bağlantı kurulamadığını göstermektedir. Dolayısıyla, daha önceki farklı çalışmalarda aday gen olabilecekleri öne sürülen bu gen polimorfizmlerinin bizim toplumumuzda çalışılan gruplarda PKOS'a yakınlıkta rolünün olmadığı görülmektedir.

PKOS ve araştırma kapsamına alınan gen polimorfizmleri için yapılan diğer çalışmalarda da farklı sonuçlar görülmektedir. Hem Türk toplumunda hem de diğer toplumlardaki farklılıklar seçilen genlerin etnik gruplara göre farklı ifadenmesi, klinik heterojenite ve çevresel faktörlerle etkileşimin her toplum için farklı olması ile açıklanabilir.

PKOS ve genetik yakınlık açısından daha kesin ve kapsamlı bir sonuç elde edebilmek için daha büyük popülasyonlarda araştırma yapılması daha net bilgilere ulaşılmasına olanak sağlayacaktır. Ayrıca, her toplumun etnik kökeni ve etkileşim içinde olduğu farklı çevresel faktörler değerlendirilerek farklı polimorfik bölgelerin analizi ve daha büyük gen bölgelerinin çalışılması bu hastalığın genetik temelini aydınlatılmasında belirleyici olacaktır.

7. ÖZET

Polikistik over sendromu (PKOS), doğurganlık çağındaki kadınlarda en yaygın endokrin bozukluklardan biridir. İlk belirtileri, ergenlik döneminde ortaya çıkmaktadır. PKOS'lu hastalarda hiperandrojenemi ve kronik anovulasyon anahtar rolü olan bulgulardır. İnsülin direnci ve obezite ile de sıklıkla karşılaşmaktadır. Erişkin kadınlarda endokrin kökenli infertilitenin en sık nedeni olup, endometrium kanseri, tip 2 diabet, hipertansiyon, koroner kalp ve damar hastalıkları için risk faktörüdür.

PKOS, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıkan ve bireysel farklılıklardan dolayı heterojen görünüm sergileyen ailesel kompleks bir hastalıktır. Genetik temeli ve kalıtım şekli henüz aydınlatılamamıştır.

Bu tez çalışmasında, PKOS'lu ergen kızlarda Calpain 10 geni SNP -44, -43, -19 ve -63, insülin reseptör geni 17.eksonda C/T ve plazminojen aktivatör inhibitör 1 geni promotor bölgesinde 4G/5G polimorfizmleri çalışılarak toplumumuzdaki sıklığın araştırılması ve sendromla genetik ilişkilerinin gösterilerek genetik yatkınlığın belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırma kapsamına Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Endokrinoloji Bilim Dalında izlenen 48 PKOS'lu ergen kız ve 50 sağlıklı birey dahil edildi. EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden genomik DNA elde edildi ve örnekler PCR-RFLP yöntemi ile genotiplendirildi. Çalışma grubunu oluşturan tüm bireyler, insülin reseptör geni ekson 12 ve devamındaki intron bölgesi DNA dizi analizi yapılarak farklı bir polimorfizm açısından değerlendirildi.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, Türk toplumunda üç farklı gene ait altı polimorfizm bakımından hasta bireyler ve kontrol grubu arasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılık ve bu polimorfizmler ile PKOS arasında anlamlı bir ilişki bulunamadığını göstermektedir. Bu durum, Türk toplumunda, bu gen polimorfizmlerinin PKOS'a yatkınlıkta rolü olmadığını düşündürmektedir.

Bu tez çalışması, PKOS ve Calpain 10 geni, insülin reseptör geni ve plazminojen aktivatör inhibitör geni polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırılması yönünden ve ergen kızlarda çalışılması bakımından toplumumuzda yapılmış ilk çalışmadır. Ancak, bu genlerin, PKOS'un genetik temeli ile olan ilişkisinin belirlenmesi yönünden daha geniş çalışma gruplarının aile temelli taranması ve ilişkili olduğu düşünülen genlere ait farklı polimorfik bölgelerin de çalışılması daha kesin ve ayrıntılı sonuçlara ulaşmamıza olanak sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Polikistik over sendromu, polimorfizm, ilişki, aday genler, Calpain 10 geni, insülin reseptör geni, PAI 1 geni.

8. SUMMARY

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disorders among the women of reproductive age. Hyperandrogenism and chronic anovulation are the key characteristics of subjects with PCOS. Insulin resistance, obesity and hirsutismus are the well-known phenotypic features associated with this disorder. On the other hand, it is the most leading cause of adult women infertility related with endocrinal reasons and an important risk factor for endometrial cancer, type 2 diabetes mellitus, hypertension and coronary heart disease.

PCOS is a familial disorder stemming from the interaction of both genetic and environmental factors, and it appears to be heterogeneous due to the individual differences. The genetic basis and the mode of inheritance of it have not been clearly established yet.

In this study, it has been aimed to investigate the prevalence and genetic susceptibility regarding three polymorphisms, that of Calpain 10 gene (SNP -44, -43, -19, -63), the insulin receptor gene (C/T SNP in exon 17) and plasminogen activator inhibitor 1 gene (4G/5G) among adolescent Turkish girls with PCOS. We have studied 44 adolescent girls with PCOS as well as the mothers of 4 subjects and a control group comprising 50 healthy girls. The genomic DNAs have been isolated from the whole blood by DNA extraction techniques and the samples have been genotyped by the PCR-RFLP method. In addition, DNA sequencing analysis has been applied to all samples in order to investigate possible appearance of a new polymorphism on exon 12 of insulin receptor gene.

Since no statistically significant difference between subjects with PCOS and control group were found, we could conclude that there is no necessary association between the above mentioned polymorphisms and PCOS. The lack of such an association leads us to suggest that polymorphisms in these genes have no role in susceptibility to PCOS in Turkish population.

Our study is the first one that investigates the association between Calpain 10 gene, insulin receptor gene, plasminogen activator inhibitor 1 gene and PCOS among Turkish adolescent girls. More studies on different polymorphic regions of suggested candidate genes and family based scanings of larger groups are needed for clearer identification of the genetic basis of PCOS in our country.

Key words: Polycystic ovary syndrome, polymorphism, associate, Calpain 10 gene, insulin receptor gene, PAI 1 gene, candidate genes.

9. KAYNAKLAR

- 1- Carmina E, Lobo RA. Polycystic ovary syndrome (PCOS): Arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84: 1897-1899.
- 2- Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: Mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev*. 1997; 18: 774-800.
- 3- Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002; 26:883-896.
- 4- Hashemipour M, Faghihimani S, Zolfaghary B, Hovsepian S, Ahmadi F, Haghighi S. Prevalance of polycystic ovary syndrome in girls aged 14-18 years in Isfahan, Iran. *Horm Res* 2004; 62: 278-282.
- 5- Haap M, Machicao F, Stefan N, Thamer C, Tschritter O, Schnuck F, Wallwiener D, Stumvoll M, Haring HU, Fritsche A. Genetic determinants of insulin action in polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2005 May;113(5):275-81.
- 6- Urbanek M, Legro RS, Driscoll DA, Azziz R, Ehrmann DA, Norman RJ et al. Thirty seven candidate genes for polycystic ovary syndrome:strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 558-565.
- 7- Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, San Millan JL The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev*. 2005 Apr;26(2):251-82.
- 8- Pang S. Hirsutism, polycystic ovary syndrome and menstrual disorders. *Pediatric Endocrinology*, Lifshitz F, (ed) 4th ed. New York, Marcel Dekker, 2003. p: 277-309.
- 9- Ojaniemi M, Pugeat M. An adolescent with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2006 Nov;155 Suppl 1:S149-52.
- 10- Witchel SF. Puberty and polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Jul 25;254-255:146-53.
- 11- Solomon CG. The epidemiology of PCOS. Prevalance and associated disease risks. *Endocrinol Metab North Am*. 1999; 28: 247-263.
- 12- Koivunen R, Endocrine and metabolic changes in women with polycystic ovaries, University of Oulu, Finland, 2001.
- 13- Baumann EE, Rosenfield RL. Polycystic ovary syndrome in adolescence. *The Endocrinologist*. 2002; 12: 333-348.
- 14- Hamburg R. Management of polycystic ovary syndrome in adolescence. *Reviews in Gynecological Practice*. 2004; 4: 148-155.
- 15- Chang RZ, Katz SE. Diagnosis of PCOS. *Endocrinol Metab North Am*. 1999; 28: 397-408.

- 16- Barnes RB, Rosenfield RL, Burstein S, Ehrmann DA. Pituitary-ovarian responses to nafarelin testing in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 1989; 320: 559-565.
- 17- Ibanez I, Hall JE, Potau N, Carrascosa A, Prat N, Taylor AE. Ovarian 17-hydroxyprogesterone hyperresponsiveness to gonadotropin-releasing hormone agonist challenge in women with polycystic ovary syndrome is not mediated by luteinizing hormone hypersecretion. *J Clin endocrinol metab.* 1996; 81: 4103-4109.
- 18- Rosenfield RL, Ghai k, Ehrmann DA, Barnes RB. Diagnosis of the polycystic ovary syndrome in adolescence: comparison of adolescent and adult hyperandrogenism. *J Pediatr Endocrinol metab.* 2000; 13: 1285-1289.
- 19- Deplewski D, Rosenfield RL. Role of hormones in plasebaceous unit development. *Endocr Rev,* 2000; 21: 363-392.
- 20- Ferriman D, Gallwey JD. *Clinical Endocrinol Metab.* 1961; 21: 1440-1447.
- 21- Carmina E. Prevalance of idiopathic hirsutism. *Eur J Endocrinol.* 1998; 31: 421-423.
- 22- Freedman DS, Jacobsen SJ, Barboriak JJ, Sobocinski KA, anderson AJ et al. Body fat distribution and male-female differences in lipids and lipoproteins. *Circulation.* 1990; 81: 1498-1506.
- 23- Barber TM, McCarthy MI, Wass JA, Franks S. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006 Aug;65(2):137-45
- 24- Goodarzi MO, Azziz R. Diagnosis, epidemiology, and genetics of the polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jun;20(2):193-205.
- 25- Sharma ST, Nestler JE. Prevention of diabetes and cardiovascular disease in women with PCOS: Treatment with insulin sensitizers. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jun;20(2):245-60.
- 26- Franks S. Adult polycystic ovary syndrome begins in childhood. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;16(2):263-72.
- 27- Arslanian S, Witchel S. Polycystic ovary syndrome in adolescents: is there an epidemic?. *Current Opinion in Endocrinology&Diabetes,* 2002; 9: 32-42.
- 28- Venkatesan AM, Dunaif A, Corbould A. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: progress and paradoxes. *Recent Prog Horm Res.* 2001;56:295-308.
- 29- Ovalle F, Azziz R. Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. *Fertil Steril.* 2002 Jun;77(6):1095-105.
- 30- Kusari J, Takata Y, Hatada E, Freidenberg G, Kolterman O, Olefsky JM. Insulin resistance and diabetes due to different

- mutations in the tyrosine kinase domain of both insulin receptor gene alleles. *J Biol Chem*. 1991 Mar 15;266(8):5260-7.
- 31- Talbot JA, Bicknell EJ, Rajkhowa M, Krook A, O'Rahilly S, Clayton RN. Molecular scanning of the insulin receptor gene in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 May;81(5):1979-83.
 - 32- Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Trends Mol Med*. 2006 Jul;12(7):324-32.
 - 33- Dunaif A. Insulin action in polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1999; 28: 341-359.
 - 34- Nestler JE, Jakubowicz DJ, Reamer P, Gunn RD, Allan G. Ovulatory and metabolic effects of D-chiro-inositol in PCOS. *N Engl J Med*. 1999; 340: 1314-1320.
 - 35- Luque-Ramirez M, San Millan JL, Escobar-Morreale HF. Genomic variants in polycystic ovary syndrome. *Clin Chim Acta*. 2006 Apr;366(1-2):14-26.
 - 36- Gilling-Smith C, Story H, Rogers V, Franks S. Evidence for a primary abnormality of thecal cell steroidogenesis in the polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol*. 1997; 47: 93-99.
 - 37- Franks S, Gharani N, Waterworth D, Batty S, White D et al. Genetics of polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 1998; 145: 123-128.
 - 38- Menke MN, Strauss JF 3rd. Genetic approaches to polycystic ovarian syndrome. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2007 Aug;19(4):355-359.
 - 39- Urbanek M. The genetics of the polycystic ovary syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007 Feb;3(2):103-11.
 - 40- Menke MN, Strauss JF 3rd. Genetics of polycystic ovarian syndrome. *Clin Obstet Gynecol*. 2007 Mar;50(1):188-204.
 - 41- Dunaif A. Insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2006 Jul;86 Suppl 1:S13-4.
 - 42- Unluturk U, Harmanci A, Kocaege C, Yildiz BO. The Genetic Basis of the Polycystic Ovary Syndrome: A Literature Review Including Discussion of PPAR-gamma. *PPAR Res*. 2007 Feb 21;2007:49109
 - 43- Yilmaz M, Bukan N, Ersoy R, Karakoç A, Yetkin İ, Ayvaz G, Cakir N. Glucose intolerance, insulin resistance and cardiovascular risk factors in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2005; 20: 2414-2415.
 - 44- Sir-Peterman T, Angel B, Maliqueu M, Carvajal F, Santos LJ et al. Prevalence of T2DM and insulin resistance in parents of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetologia*. 2004; 45:959-964.
 - 45- Yildiz BO, Yaralı H, Oğuz H, Bayraktar M. Glucose intolerance, insulin resistance and hyperandrogenemia in first degree relatives of women with PCO. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(5): 2031-2036.

- 46- Legro RS, Driscoll D, Strauss JF 3rd, Fox J, Dunaif A. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14956-60.
- 47- Govind A, Obhrai MS, Clayton RN. Polycystic ovaries are inherited as an autosomal dominant trait: analysis of 29 polycystic ovary syndrome and 10 control families. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Jan;84(1):38-43.
- 48- Kurzrock R, Cohen PR. Polycystic ovary syndrome in men: Stein-Leventhal syndrome revisited. *Med Hypotheses*. 2007;68(3):480-3.
- 49- Duskova M, Starka L. The existence of a male equivalent of the polycystic ovary syndrome--the present state of the issue. *Prague Med Rep*. 2006;107(1):17-25.
- 50- Starka L, Duskova M, Cermakova I, Vrbikova J, Hill M. Premature androgenic alopecia and insulin resistance. Male equivalent of polycystic ovary syndrome? *Endocr Regul*. 2005 Dec;39(4):127-31.
- 51- Duskova M, Cermakova I, Hill M, Vankova M, Samalikova P, Starka L. What may be the markers of the male equivalent of polycystic ovary syndrome? *Physiol Res*. 2004;53(3):287-94.
- 52- Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Jun;91(6):2100-4.
- 53- Jahanfar S, Eden JA, Warren PW, Seppala M, Nguyen TV. A twin study of PCOS. *Fertil Steril*. 1995; 63: 478-486
- 54- Diamanti-Kandarakis E, Piperi C. Genetics of polycystic ovary syndrome: searching for the way out of the labyrinth. *Hum Reprod Update*. 2005 Nov-Dec;11(6):631-43.
- 55- Crosignani PG, Nicolosi AE. Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity. *Hum Reprod Update*. 2001 Jan-Feb;7(1):3-7.
- 56- Legro RS, Strauss JF. Molecular progress in infertility: polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2002 Sep;78(3):569-76.
- 57- Seino S, Seino M, Nishi S, Bell GI. Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jan;86(1):114-8.
- 58- Sesti G. Insulin receptor variant forms and type 2 diabetes mellitus. *Pharmacogenomics*. 2000 Feb;1(1):49-61.
- 59- Sesti G, Federici M, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms. *Diabetes Metab Res Rev*. 2001 Sep-Oct; 17 (5): 363-73.
- 60- Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*. 2004 Feb; 53 Suppl 1: S12-8.
- 61- Huang Y, Wang KK. The calpain family and human disease. *Trends Mol Med*. 2001 Aug; 7 (8): 355-62.

- 62- Turner MD, Cassell PG, Hitman GA. Calpain-10: from genome search to function. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005 Nov-Dec; 21 (6): 505-14.
- 63- Wiltgen D, Furtado L, Kohek MB, Spritzer PM. CAPN10 UCSNP-43, UCSNP-19 and UCSNP-63 polymorphisms and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2007 Mar; 23 (3): 173-8.
- 64- Permutt MA, Bernal-Mizrachi E, Inoue H. Calpain 10: the first positional cloning of a gene for type 2 diabetes? *J Clin Invest*. 2000 Oct; 106 (7): 819-21.
- 65- Baier LJ, Permana PA, Yang X, Pratley RE, Hanson RL, Shen GQ, et al. A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000 Oct; 106 (7): 819-21.
- 66- Strandberg L, Lawrence D, Ny T. The organization of the human-plasminogen-activator-inhibitor-1 gene. Implications on the evolution of the serine-protease inhibitor family. *Eur J Biochem*. 1988 Oct 1;176 (3): 609-16.
- 67- Nordt TK, Lohrmann J, Bode C. Regulation of PAI-1 expression by genetic polymorphisms. Impact on atherogenesis. *Thromb Res*. 2001 Sep 30;103 Suppl 1:S1-5.
- 68- Ding J, Nicklas BJ, Fallin MD, de Rekeneire N, Kritchevsky SB, Pahor M, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene polymorphisms and haplotypes are associated with plasma plasminogen activator inhibitor type 1 levels but not with myocardial infarction or stroke. *Am Heart J*. 2006 Dec;152 (6): 1109-15.
- 69- Walch K, Grimm C, Huber JC, Nagele F, Kolbus A, Hefler LA. A polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene promoter and the polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005 Nov 1; 123 (1): 77-81.
- 70- Glueck CJ, Sieve L, Zhu B, Wang P. Plasminogen activator inhibitor activity, 4G5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor 1 gene, and first-trimester miscarriage in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism*. 2006 Mar; 55 (3): 345-52.
- 71- Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragon MJ, Figueroa MJ, Velarde P, et al. Specific CAPN10 gene haplotypes influence the clinical profile of polycystic ovary patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Nov; 88 (11): 5529-36.
- 72- Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Yamaguchi H, Ohnuma H, Igarashi M, Manaka H, Kato T. Calpain 10 gene polymorphisms are related, not to type 2 diabetes, but to increased serum cholesterol in Japanese. *Diabetes Res Clin Pract*. 2002 May; 56 (2): 147-52.
- 73- Evans JC, Frayling TM, Cassell PG, Saker PJ, Hitman GA, Walker M. Studies of association between the gene for calpain-10 and type

- 2 diabetes mellitus in the United Kingdom. *Am J Hum Genet.* 2001 Sep; 69 (3): 544-52.
- 74- Haddad L, Evans J, Gharani N, Robertson C, Rush K, Wiltshire S, et al. Variation within the Type 2 Diabetes susceptibility gene calpain- 10 and polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism.* 2002; 87 (6): 2606-2610.
 - 75- Waterworth DM, Bennett ST, Gharani N, McCarthy MI, Hague S, Batty S et al. Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet.* 1997; 349: 986-990.
 - 76- McKeigue P, Wild S, Bennett SD, Todd JA, Waterworth DM, Franks S, McCarthy MI. Association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet.* 1997; 349: 1771-1772.
 - 77- Bennett SD, Todd JA. Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes. *Annu Rev Genet.* 1996; 30: 343-370.
 - 78- Huxtable SJ, SakerPJ, Haddad LŞ, Walker M, Frayling TM, Levy JC et al. Analysis of parent offspring trios provides evidence for linkage and association between the insulin gene and type 2 diabetes mediated exclusively through paternally transmitted class III VNTR alleles. *Diabetes.* 2000; 49: 126-130.
 - 79- Escobar-Morreale HF, Peral B, Villuendas G, Calvo RM, Sancho J, San Millan JL. Common single nucleotide polymorphisms in intron 3 of the calpain-10 gene influence hirsutism. *Fertil Steril.* 2002 Mar;77(3):581-7.
 - 80- Ehrmann DA, Schwarz PE, Hara M, Tang X, Horikawa Y, Imperial J, et al. Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Apr; 87 (4): 1669-73.
 - 81- Vollmert C, Hahn S, Lamina C, Huth C, Kolz M, Schopfer-Wendels A, et al. Calpain-10 variants and haplotypes are associated with polycystic ovary syndrome in Caucasians. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Mar; 292 (3): E836-44.
 - 82- Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragon MJ, Figueroa MJ, Velarde P, et al. CAPN10 alleles are associated with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Aug; 87 (8): 3971-6.
 - 83- Ohro-Melander M, Klannemark M, Svensson MK, Ridderstrale M, Lindgren CM, Groop L. Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes.* 2002 Aug; 51 (8): 2658-64.
 - 84- Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Ohro-Melander M et al. Genetic variation in the gene encoding Calpain 10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* 2000; 26: 163-175.
 - 85- Moller DE, Flier JS. Detection of an alteration in the INSR gene in a patient with insulin resistance. *N Engl J Med.* 1988; 319:1526-1529.

- 86- Cama A, de la Luz, Ottini L, Kadowaki T, Gorden P et al. A mutation in the tyrosin kinase domain of the insulin receptor associated with insulin resistance in an obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 73: 894-901.
- 87- Kim H, Kadowaki H, Sakura H, Odawara M, Momomura K, Takashi Y, Miyazaki Y et al. Detection of mutations in the INSR gene in patients with insulin resistance by analysis of SSCP. *Diabetologia.* 1992; 35: 261-266.
- 88- Tucci S, Futterweit W, Concepcion ES, Greenberg DA, Villanueva R, Davies TF, Tomer Y. Evidence for association of polycystic ovary syndrome in caucasian women with a marker at the insulin receptor gene locus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jan;86(1):446-9.
- 89- Siegel S, Futterweit W, Davies TF, Concepcion ES, Greenberg DA, Villanueva R, Tomer Y. A C/T single nucleotide polymorphism at the tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is associated with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2002 Dec;78(6):1240-3.
- 90- Lee EJ, Yoo KJ, Kim SJ, Lee SH, Cha KY, Baek KH. Single nucleotide polymorphism in exon 17 of the insulin receptor gene is not associated with polycystic ovary syndrome in a Korean population. *Fertil Steril.* 2006 Aug;86(2):380-4.
- 91- Jin L, Zhu XM, Luo Q, Qian Y, Jin F, Huang HF. A novel SNP at exon 17 of INSR is associated with decreased insulin sensitivity in Chinese women with PCOS. *Mol Hum Reprod.* 2006 Mar;12(3):151-5.
- 92- Gris JC, Neveu S, Mares P et al. Plasma fibrinolytic activators and their inhibitors in women suffering from early recurrent abortion of unknown etiology. *J Lab Clin Med.* 1993; 122: 606-615.
- 93- Kinik ST, Atac FB, Verdi H, Cetintas S, Sahin FI, Ozbek N. The effect of plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism on glucose and lipid metabolisms in Turkish obese children. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005 May; 62 (5): 607-10.
- 94- Diamanti-Kandarakis E, Palioniko G, Alexandraki K, Bergiele A, Koutsouba T, Bartzis M. The prevalence of 4G5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene in polycystic ovarian syndrome and its association with plasma PAI-1 levels. *Eur J Endocrinol.* 2004 Jun;150 (6): 793-8.
- 95- Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, Lapidus L, Tengborn L. Hemostatic and metabolic variables in women with PCOS. *Fertility and Sterility.* 1994; 61: 455-460.
- 96- Eriksson P, Kallin B, Bavenholm P, Hamsten A. Allele specific increase in basal transcription of the PAI 1 gene is associated with myocardial infarction. *PNAS.* 1995; 92: 1851-1855.
- 97- Jorgenson E, Deitcher SR, Cicek M, Liu X, Plummer S, Casey G, Witte JS. Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1)

polymorphism 4G/5G is associated with prostate cancer among men with a positive family history. *Prostate*. 2007 Feb 1;67(2):172-7.

- 98- Geishofer G, Binder A, Muller M, Zohrer B, Resch B, Muller W. 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene in children with systemic meningococcaemia. *Eur J Pediatr*. 2005 Aug; 164 (8): 486-90.
- 99- Yamamoto K, Saito H. A pathological role of increased expression of PAI 1 in human or animal disorders. *Int J Haematol*. 1998; 68(4): 371-385.
- 100- Karadeniz M, Erdoğan M, Berdeli A, Saygılı F, Yılmaz C. 4G/5G polymorphism of PAI 1 gene and Alu repeat I/D polymorphism of TPA gene in Turkish patients with PCOS. *J Assist Reprod Genet*. 2007 Sep; 24 (9): 412-8.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı : TUĞBA
Soyadı : ÜNSAL
Doğum Yeri ve Tarihi: ANKARA, 11/02/1975

Eğitimi :

2002- : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD
Doktora Programı

1996-1998: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD Yüksek
Lisans Programı

1991-1995: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dili: İngilizce