

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

21-HİDROKSİLİZ EKSİKLİĞİNE BAĞLI KLASİK TIP
KONJENİTAL ADRENAL HİPERPLAZİ' DE GEN
MUTASYON ANALİZİ SONUÇLARININ KLİNİKLE
İLİŞKİLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Berk ÖZYILMAZ

Samsun
Temmuz-2010

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

21-HİDROKSİLİZ EKSİKLİĞİNE BAĞLI KLASİK TIP
KONJENİTAL ADRENAL HİPERPLAZİ' DE GEN
MUTASYON ANALİZİ SONUÇLARININ KLİNİKLE
İLİŞKİLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Berk ÖZYILMAZ

Danışman: Prof. Dr. Gönül OĞUR

Samsun
Temmuz-2010

Kabul Onay

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle yolumu çizdiğim, tıbbi ve sosyal konulara bakış açımı geliştirmemde bana yardımcı olan sayın hocam Prof. Dr. Gönül OĞUR' a,

Öğrencilik ve uzmanlık eğitimimde bilgilerinden faydalandığım 19 Mayıs Üniversitesi' nin tüm hocalarına,

Bu uzun yolda yorgunluklarımı azaltan, dertlerimi paylaşan Tıbbi Genetik Anabilimdalı' nın asistanları ve tüm çalışanlarına,

Bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan ve bütün kararlarımın arkasında duran aileme,

Zor günlerimde devam etmeme yardımcı olan hayat arkadaşşıma,

Yanımda olduğunuz için TEŞEKKÜR EDERİM...

ÖZET

Kuşkulu genital yapı cinsel gelişim bozukluklarının en sık karşılaşılan fenotipik yansıması olarak görülmektedir. Kuşkulu genital yapının en sık karşılaşılan nedeni ise Konjenital Adrenal Hiperplazi (KAH)' dir. KAH vakalarının %90-95' inden fazlasından 21-Hidroksilaz eksikliği sorumludur.

Çalışmamızda 21-Hidroksilaz eksikliğine bağlı klasik konjenital adrenal hiperplazi tanılı 26 hastada PCR-RFLP ve MLPA teknikleriyle saptanan CYP21 geninin mutasyonları derlenmiş, saptanmış olan mutasyonların dağılımının ortaya konulması, hastalıkla ilgili genotip fenotip ilişkisi kurulması ve bu iki tekniğin etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmaya yaş aralığı gözetmeksizin 2005-2010 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ile Pediatri Anabilim Dalı Genetik ve Endokrinoloji Bilim Dalları tarafından takip edilen 21-Hidroksilaz Eksikliğine bağlı Klasik Tip Konjenital Adrenal Hiperplazi tanılı sitogenetik ve CYP21 ilişkili moleküler genetik çalışmaları tamamlanmış 26 hasta dahil edilmiştir.

Hasta popülasyonunun % 96,19' unda mutasyon saptanmış, bölgemize ait bir mutasyon dağılımı ortaya konulmuştur. Çalışmamıza katılan hasta grubunda mutasyon saptanabilen hastaların tümünde tam bir genotip-fenotip ilişkisi kurulabilmiştir. PCR-RFLP ile etkinliği karşılaştırılan MLPA yönteminin, PCR-RFLP ile saptanan delesyonların tamamını, saptanabilir nokta mutasyonlarının %83' ünü onayladığı gösterilmiştir.

ABSTRACT

Genital ambiguity is being defined as the most common phenotype of the sexual differentiation disorders. Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is the most common cause of genital ambiguity, and 90–95% of CAH cases are caused by 21-hydroxylase deficiency.

In this study we aimed to identify the frequency of the mutations detected with PCR-RFLP and MLPA methods in the CYP21 gene, to correlate genotype with phenotype and to compare the efficiency of these two molecular genetic methods.

To establish this data 26 patients diagnosed with 21-Hydroxylase deficiency were checked for CYP21 ene mutations retrospectively.

Mutations were found in 96,19 % (25/26) of the patients. All mutation detected patients well correlated with phenotype. The method MLPA was able to detect all of the deletions. Point mutations detected by PCR and RFLP were partially detected by MLPA.

Tablolar	Sayfa
Numarası	
Tablo 1. Human Gene Mutation Database (HGMD) 15.03.2010 tarihine kadar tanımlanmış CYP21A2 mutasyonlarının tipleri	27
Tablo 2. CYP21' de sık saptanan mutasyonlar, fonksiyonel etkileri ve klinik ilişkileri	31
Tablo 3. CYP21' de sık saptanan mutasyonlar ve klinik ilişkileri.	33
Tablo 4. CYP21 geni PCR amplifikasyonunda kullanılan primerlerin dizileri.	47
Tablo 5. PCR çalışmasında kullanılan primerler ve elde edilen PCR fragmanlarının büyüklükleri.	47
Tablo 6. PCR çalışmasında kullanılan bileşenlerin miktarları.	48
Tablo 7. PCR çalışmasında kullanılan Thermal Cycler programları	49
Tablo 8. RFLP' de kullanılan bileşenlerin miktarları.	51
Tablo 9. Enzimle kesim ürünlerinin beklenen DNA segment uzunlukları.	52
Tablo 10. Ekzon 1, 3, 4, 6 ve 8' e yönelik hazırlanmış problemler, ilgili mutasyonlar.	53
Tablo 11. SALSA MLPA KIT P050-B2 CAH (Lot0408) kiti prob içeriği.	54
Tablo 12. Hastaların başvuru yaşları, nedenleri ve muayene bulguları	64
Tablo 13. Tuz kaybettiiren fenotipli hastaların başvuru nedenleri, ilk bulguları ve genotipleri.	71
Tablo 14. Basit virilizan fenotipli hastaların başvuru nedenleri ve genotipleri.	72
Tablo 15. Hasta grubunda saptanan mutasyonlar	73
Tablo 16. Hasta grubunda saptanan allel frekansları.	73
Tablo 17. AU kodlu hastada saptanan homozigot IVS2 mutasyonunun PCR ve RFLP jel görüntüsü	74
Tablo 18. EZ kodlu hastada saptanan homozigot geniş delesyonun PCR ve RFLP jel görüntüsü.	75
Tablo 19. GC kodlu hastada saptanan homozigot I172N mutasyonunun PCR ve RFLP jel görüntüsü.	75
Tablo 20. OS kodlu hastada saptanan homozigot Q318X	76

mutasyonunun PCR ve RFLP jel görüntüsü.

Tablo 21.	AO kodlu hastada saptanan homozigot R356W	76
mutasyonunun PCR ve RFLP jel görüntüsü		
Tablo 22.	HG kodlu hastada saptanan “compound heterozigot”	77
V281L/P30L mutasyonunun PCR ve RFLP jel görüntüsü		
Tablo 23.	RS kodlu hastada saptanan homozigot E6 CLUSTER	77
mutasyonunun PCR ve RFLP jel görüntüsü		
Tablo 24.	DAK kodlu hastada saptanan homozigot geniş delesyonun	78
PCR ve RFLP jel görüntüsü		
Tablo 25.	PCR yöntemiyle delesyon saptanmış hastaların MLPA sonuçları	80
Tablo 26.	RFLP yöntemiyle Q318X, I172N ya da	81
E6 cluster mutasyonu saptanmış hastaların MLPA sonuçları		
Tablo 27.	Çalışmamızda ve literatürdeki çeşitli çalışmalarda	
saptanan allel frekansları		85

Şekiller	Sayfa
Numarası	
Şekil 1. Erkek ve dişide ürogenital sinüs ve dış genital yapının normal ve anormal farklılaşması	5
Şekil 2. Erkek ve dişi fetüslerin gestasyonel haftalara göre prenatal cinsel farklılaşması	7
Şekil 3. Kuşkulu genital yapıya yaklaşım	12
Şekil 4. Adrenal bez	14
Şekil 5. Steroid biyosentezinin yolları	16
Şekil 6. CYP21 geni ve 6p21.3 bölgesindeki yerleşimi	23
Şekil 7. “Unequal Crossing Over” ile delesyon oluşumu	28
Şekil 8. Sık görülen 8 mutasyon, geçişindeki pozisyonları ve fenotipik etkileri	32
Şekil 9. Sık görülen mutasyonlar, enzim aktivitesine etkileri ve fenotipik sonuçları	34
Şekil 10. KAH’ de prenatal tedavi yaklaşımı	37
Şekil 11. PCR reaksiyonu.	38
Şekil 12. MLPA reaksiyonun basamakları	43
Şekil 13. PCR’ da elde edilen fragmanların gendeki ekzonlarla ilişkisi.	48
Şekil 14. Coffalyser prediction sonucu örneği	57
Şekil 15. E6 Cluster I236N mutasyonunun enzimle kesim yöntemiyle gösterilmesi.	66
Şekil 16. CYP21 Geninin Fragman 1 PCR ürününün E6 Cluster mutasyonunun incelenmesi için MboI enzimiyle kesim görüntüsü	66
Şekil 17. CYP21 Geninin Fragman 1 PCR ürününde V281L mutasyonunun incelenmesi için Alw21I Enzimiyle kesim görüntüsü	67
Şekil 18. CYP21 Geninin Fragman 1 PCR ürününde Q318X mutasyonunun incelenmesi için PstI enzimiyle kesim görüntüsü	67
Şekil 19. CYP21 Geninin Fragman 1 PCR ürününün R356W mutasyonunun incelenmesi için AciI enzimiyle kesim görüntüsü	68
Şekil 20. CYP21 Geninin Fragman 4 PCR ürününde P30L mutasyonunun incelenmesi için AciI enzimiyle kesim görüntüsü	68

Şekil 21.	CYP21 Geninin Fragman 2 PCR ürününün AluI Enzimiyle Kesim Görüntüsü	70
Şekil 22.	CYP21 Geninin Fragman 3 PCR ürününün BseI Enzimiyle Kesim Görüntüsü	70
Şekil 23.	MLPA kapiller elektroforezi örnek pik görüntüleri	81

Simgeler-Kısaltamalar

KAH	Konjenital Adrenal Hiperplazi
CYP21	CYTOCHROME P450, SUBFAMILY XXI
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
DNA	Deoksiribonükleik asit
AMH	Anti Müllerian Hormon
HCG	Human Koryonik Gonadotropin
LH	Lüteinizan hormon
FSH	Folikül stimüle edici hormon
SRY	Sex-determining Region Y
WT-1	Willms Tumor Protein geni
SOX-9	Sex determining region Y-box 1
DAX-1	Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1
STAR	Steroidogenic acute regulatory protein
KAIS	komplet androjen insensitivite sendromu
17-OHP	17 hidroksi progesteron
ACTH	Adreno kortikotropik hormon
DHEA	Dehydroepiandrosterone
LDL	Low Density Lipoprotein
HDL	High Density Lipoprotein'den
P450scc	Sitokrom P450 Side Chain Cleavage
DOC	Deoksikortikosteron
OMIMOnline	Mendelian Inheritance in Man
HLA	human leukocyte antigen
ISCN	International System For Human Cytogenetic Nomenclature

TEŞEKKÜR	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TABLolar	IV-V
ŞEKİLLER	VI-VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Erkek ve Dişinin Normal Cinsel Gelişimi	3
2.2 Cinsel gelişim Bozuklukları	6
2.3 Cinsel gelişim Bozukluklarına Yaklaşım	10
2.4 Adrenal Bez	12
2.5 Konjenital Adrenal Hiperplazi	17
2.6 Konjenital Adrenal Hiperplazi’ de Genotip Fenotip İlişkisi	29
2.7 Konjenital Adrenal Hiperplazi’ de Prenatal Tanı ve Tedavi Yaklaşımları	31
2.8 Konjenital Adrenal Hiperplazi tanısında kullanılabilecek Genetik Tanı Yöntemleri	33
3. MATERYAL VE METOD	40
3.1 Materyal	41
3.2 Metod	41
4. BULGULAR	
4.1 Klinik Bulgular	55
4.2 Moleküler Genetik Sonuçlar	57
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇLAR	80
7. REFERANSLAR	81

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Cinsel gelişim, yumurtanın X ya da Y kromozomu içeren bir sperm tarafından döllenmesiyle başlamaktadır. Kromozomların yönlendirmesiyle farklılaşan gonadlar hormonları düzenleyerek cinsel farklılaşmayı yönetmektedirler. Normal kromozomal yapı, normal gonad gelişimi ve hormonların doğru düzenlenmesi normal cinsel farklılaşma ve olgunlaşma için gereklidir. Cinsel gelişim bozukluklarında kuşkulu genital yapı; iç ve dış genitallerin uyumsuzlukları; gonadların, iç genital, dış genital yapıların yetersiz gelişimleri ve gonadal gelişim bozuklukları görülebilmektedir.

Kuşkulu genital yapı, cinsel gelişim bozukluklarının en sık karşılaşılan fenotipik yansıması olarak görülmektedir. Kuşkulu genital yapının en sık karşılaşılan nedeni ise Konjenital Adrenal Hiperplazi (KAH)' dir. Hastalığın temelinde yatan kortizol sentezinde görevli enzimlerin yetersizliklerinden KAH' a en sık neden olanı 21-Hidroksilaz enziminin eksikliğidir (3, 5, 7, 11). 21-Hidroksilaz enziminin eksikliğine bağlı ortaya çıkan Klasik KAH'da, dişiler prenatal dönemde yüksek androjen etkisine maruz kalıp virilize dış genitalyaya ile doğabilmektedirler. Etkilenmiş hastalarda aldosteron yetersizliği, hayatı tehdit edici elektrolit dengesizliklerine neden olabilmektedir.

Bindokuzyüzseksendört yılında CYP21 geninin klonlanması ve KAH ile ilişkilendirilmesi, 21-Hidroksilaz eksikliğine bağlı KAH'da moleküler genetik çalışmaları hızlandırmıştır (20). Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalarda CYP21 lokusunda hastalıkla ilgili 127 farklı mutasyon saptanmıştır (17). Saptanan mutasyonların fenotipik etkilerinin tartışılması, hastalıkla ilgili bazı net genotip-fenotip ilişkilerinin kurulmasına imkan vermiştir. 21-Hidroksilaz eksikliğine bağlı Klasik KAH'da en sık görülen allel olan nt656g'nin intron 2'de "anormal splicing" e neden olarak enzim aktivitesinin tama yakın kaybına yol açması, klinikte tuz kaybettiren ve ağır virilizan etkileri ortaya çıkarmaktadır (3). Benzer şekilde saptanan mutasyonların fenotiple ilişkilendirilmesi, etkilemiş hastalarla ilgili prognostik bilgiler verebildiği gibi prenatal tanı ve tedavi yaklaşımlarını da yönlendirebilmektedir. Ülkemizde ise KAH ve CYP21 gen mutasyon çalışmaları sınırlı sayılarda gerçekleştirilmiş olduğundan hastalıkla ilişkili mutasyonların ülkemize özgü dağılımları ve klinik ilişkileri ile ilgili bilgiler sınırlıdır.

Çalışmamızda 21-Hidroksilaz Eksikliğine Bağlı Klasik KAH hastalarında, PCR, RFLP ve MLPA yöntemleriyle gerçekleştirilmiş olan CYP21 geni moleküler analizlerinin sonuçları derlenmiştir. Moleküler genetiğin en temel tanı araçlarından PCR ve RFLP ile göreceli olarak yeni bir moleküler tanı yöntemi olan MLPA' nın kullanıldığı çalışmamızda, mutasyonların sıklıklarının belirlenmesi, hastalarının fenotipleriyle ilişkilendirilmesi ve kullanılan moleküler analiz yönteminin etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Erkek ve Dişinin Normal Cinsel Gelişimi

Normal cinsel gelişim birçok basamaktan oluşan komplike bir olaydır. Bu basamakların başarı ile tamamlanması, erkek ve dişiye birbirinden ayıran en önemli özelliğin, cinsel kimliğin belirlenmesini sağlar. Cinsiyetin belirlenmesi X kromozomu taşıyan bir ovumun, X ya da Y kromozomu taşıyan bir sperm ile döllenmesiyle başlar. İki X kromozomu taşıyan embryo dişi yönde, bir X ve bir Y kromozomu taşıyan embryo ise erkek yönde farklılaşır.

2.1.1 Erkeklerde Farklılaşma

Gonadlar

Erkeklerde Y kromozomunun kısa kolundaki cinsiyet tanımlayıcı bölgede yerleşmiş spesifik genler testis farklılaşmasını yönetir. Gestasyonel ilk 5-6 haftada aktif olan WT1, LIM1, FTZF1 ve GATA4 gibi genler nötral iç ve dış genital yapıları sağlar. 6. haftadan itibaren aktive olan SRY, SOX3 ve SOX9 gibi genler ise bipotansiyel gonaddan testiküler farklılaşmayı yönetir ve Müllerian yapıların gelişimini baskılayan Anti-Müllerian Hormon (AMH) üretimini başlatır (1, 2, 6).

İç Genital Yapı

Erkek embryonun bipotansiyel iç genital yapısı, 6-7. haftada AMH' nin Sertoli hücrelerinden salgılanarak Müllerian yapıların geriletmesiyle ve 8.haftada testesteronun Leydig hücrelerinden salgılanarak, epididimis ve vaz deferens'i oluşturmak için Wolffian kanal gelişimini indüklemesiyle, erkek yönüne farklılaşır. Wolffian kanaldan kaynak alan erkek iç genital organları olan epididimis, duktus deferens, ejakülatör kanallar ve seminifer tübüller gelişmek için yüksek testesteron salınımına ihtiyaç duyarlar (1, 2, 6).

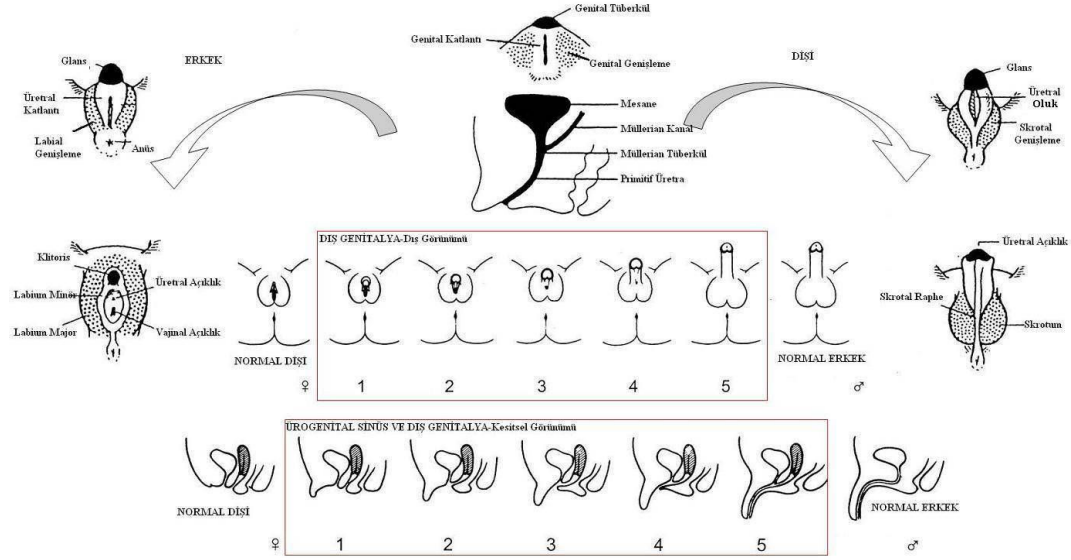
Dış Genital Yapı

Dördüncü. gestasyonel haftada belirginleşmeye başlayan genital tüberkülün büyüklüğü başlangıçta her iki cinsiyette aynıdır. Fetal testislerde androjen üretilmeye başlanması ve özellikle dihidrotestesteron' un varlığı genital tüberkülün genişlemesine ve ürogenital katlantıların öne çekilmesine neden olur. Bu da uretral katlantı meydana getirir. Ürogenital katlantıların birleşmesiyle penil üretra oluşur. Üretranın etrafındaki dokuda corpus cavernosum gelişmeye başlar. Labioskrotal şişkinlikler ortada birleşerek skrotumu oluşturur. 14. gestasyonel haftaya gelindiğinde fallus büyümesi ve testin inmesi dışındaki erkek dış genital farklılaşması tamamlanmıştır. Testisler yaklaşık gestasyonel 32. haftada skrotuma girmiş olurlar (1, 2, 6).

2.1.2 Dişide Farklılaşma

Gonadlar-İç Genital Yapı-Dış Genital Yapı

Dişi embryoda Y kromozomu yokluğunda bipontasiyel gonad over yönünde farklılaşır; testis olmadığından AMH üretilmez; uterus, fallopian tüpler ve üst vajina gelişimi sürer. Başlangıçta genital tüberkül hızlı büyür fakat androjenlerin olmayışı büyümeyi yavaşlatıp penis yerine klitoris dokusunun ortaya çıkmasına neden olur. Benzer şekilde androjen etkisi altında olmayan labioskrotal şişkinlikler ortada birleşmez labia majora oluşur. 11. haftada nötral dış dişi genital yapı tamamlanmıştır (1, 2, 3).



Şekil 1. Erkek ve dişide ürogenital sinüs ve dış genital yapının normal ve anormal farklılaşması (Speiser ve ark. değiştirilerek alınmıştır) (3).

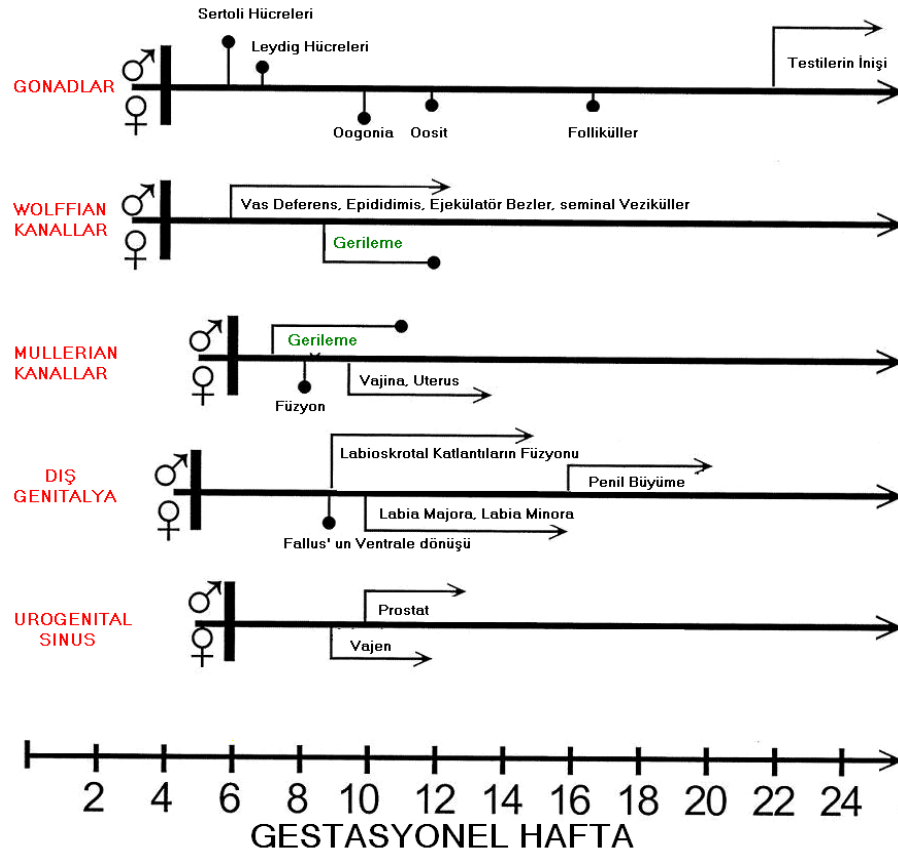
2.1.3 Üreme Hücrelerinin Gelişimi

Over veya testisi oluşturacak gonadların gelişimi 5. haftada ürogenital kıvrımın medioventral kenarındaki kalınlaşmayla başlar. Bu bölgedeki çöломik ya da mesodermik epitelyumdaki ve alttaki mezankim dokusundaki proliferasyon, ileryen günlerde gonadal çıkıntıyı oluşturur. Gonadal çıkıntı içindeki epitelyal projeksiyonlar gonadın korteks ve medulla bölgelerini ortaya çıkarır. Primordial germ hücreleri ise ilk olarak Yolk kesesi duvarında 4. gestasyonel haftada görünürler yani ekstragonadal kaynaklıdır. Hızla çoğalan ve gonadal çıkıntıya doğru göç eden bu hücreler, 6. haftada gonadal çıkıntıya girerler ve primer seks korduna yerleşirler. Bu aşamadan önce morfolojik olarak iki cins ayırt edilemez. Primordial germ hücrelerinden farklılaşmaya kadar gonadal çıkıntıya ulaşamayanlar ileride ekstragonadal germ hücre tümörlerine neden olabilirler (1, 2, 6).

Erkek fetüste yaklaşık 7. haftada testiküler farklılaşma belirginleşir. Bundan sonra primitif seks kordu seminifer kord adını alır, gelişen gonad dokusu içine medullaya doğru ilerler. Seminifer kordları birbirinden mezankim tabakası ayırır ve bu

tabaka sonradan interstisyel hücreleri ya da Leydig hücrelerini oluşturur. Seminifer korda primitif germ hücreleri dışında yüzey epitelyumu kaynaklı sertoli hücreleri de vardır. Leydig hücreleri testiste plasental hCG etkisi ile 8-9. gestasyonel haftalarda testesteron sentezine başlar. Leydig hücrelerinden testesteron sentezini uyaran 2. temel faktör LH' dır, fakat fetal hipofiz ancak 12.haftalarda LH salgılamaya başlar. Doğumda seminifer tüpler spermatogonia ile doludur. Bunlar son prepuberteal dönemde primer spermatositlere dönüşür. Pubertede ise mayozla matür spermatositler oluşur (1, 2, 6).

Dişi fetüste ise testis belirleyici faktörlerin olmayışı gonad farklılaşmasını overe yönlendirir. Testis gelişimi yönüne kayamayan bipotansiyel gonad, 12. gestasyonel haftaya kadar farklılaşmamış halde kalır. Bu dönemden sonra germ hücreleri oogonia olarak çoğalmaya başlar. Doğumdan sonra oogonia oluşmaz. 12. haftadan sonra oogonia oositlere dönüşür ve gerçek over yapısı gelişmeye başlar. 16. haftada primordial folliküller gelişmeye başlar, fakat follükül gelişimi fetal FSH etkisi ile 20-25 gestasyonel haftalarda 6-7 milyon ile en yüksek düzeyine ulaşır. Bundan sonraki 7 aylık intrauterin dönemde sağ kalan ve 1. Mayoz' un profazında kalmış olan oosit sayısı iyice azalır. Pubertede başlayan ovulasyona kadar bu hücreler bu fazda kalır. Erkekteki sertoli ve Leydig hücrelerinin dişideki homologları olan Granülosa ve Teka hücrelerinin dişi genital gelişimine katkıları tam bilinmese de granülosa hücrelerinin oositler üzerinde anti-mayotik etkisi olduğu bildirilmiştir (1, 2, 3) (Şekil 2).



Şekil 2. Erkek ve dişi fetüslerin gestasyonel haftalara göre prenatal cinsel farklılaşması (Speiser ve ark. değiştirilerek alınmıştır) (3).

2.2 Cinsel Gelişim Bozuklukları

Cinsel gelişim, yumurtanın dölLENmesiyle belirlenen **kromozomal seks**, kromozomların yönlendirmesiyle belirlenen **gonadal seks** ve çoğunlukla gonadal hormonların yönetmesiyle oluşan **fenotipik seks** ile sonlanan çok basamaklı bir mekanizmadır (4, 5, 6). Bu mekanizmayı farklı noktalardan bozan birçok etken cinsel gelişim bozukluklarına neden olur. Cinsel gelişim bozukluklarında kuşku genital yapı, iç ve dış genitallerin uyumsuzlukları, cinsiyet organlarının yetersiz gelişimleri, cinsiyet kromozom anomalileri ve gonadal gelişim bozuklukları görülmektedir. Bu anormal fenotiplerin ortaya çıkışında etkisi olan faktörler etkiledikleri gelişim aşamasına göre şu şekilde örneklenebilir:

2.2.1 Kromozomal Cinsiyet Gelişimin Hastalıkları

Cinsiyet kromozomlarının mayoz esnasında ayrılamaması sonucu, bu hatayı taşıyan üreme hücresinin oluşturduğu embryoda 2 hastalık ortaya çıkabilir:

- **Klinefelter Sendromu**

1/500 yenidoğan erkekte bir görülür. Etkilenmiş hastaların karyotipi 47,XXY' dir fakat 46,XY/46,XXY mozaizmi ve ikiden fazla X kromozomu ve bir Y kromozomuyla seyreden varyantları da vardır. Klinik olarak puberte öncesi normal erkek fenotipiyle küçük testislere sahip hastalar puberte sonrası buna ek olarak jinekomasti geliştirirler. Fenotipik olarak erkek görünümündedirler ve ejakülatlarında sperm yoktur (5).

- **Turner Sendromu**

Primer amenore, yetersiz sekonder seks karakterleri, kısa boy, çoklu organ anomalileriyle seyreden fenotipin nedeni, monozomi X' in ön planda olduğu bir X kromozomun kısmi ya da tamamının yokluğu ile ilişkili kromozom kuruluşlarıdır.

2.2.2 Gonadal Cinsiyet Gelişiminin Hastalıkları

Kromozomal cinsiyet belirlenmesinin sağlıklı olduğu fakat gonadal farklılaşmanın anormal olduğu durumlar Gonadal Cinsiyet Gelişiminin Hastalıkları' nı içerir.

- **Gonadal Disgenez**

Normal 46,XY ya da 46, XX karyotipi olan bireylerde, yetersiz bir dişi fenotip ve “streak” gonadlar bulunur. Kromozomal seks XX ya da XY olsa da cinsel fenotip dişidir. Bunun nedeni gonadal gelişimin yetersiz olması ve farklılaşmayı erkek yönüne kaydıramamasıdır. Bu da gonadların gelişiminin AMH salımından ve androjen üretiminden daha önce durmuş olmasından kaynaklanır (4, 5, 6).

- **Tam Gonadal Disgenez ve SRY**

Saf Gonadal Disgenezde olduğu gibi tam gonadal disgenezde de gonadlar farklılaşmayı erkek yönüne kaydıramamaktadır, sebebi sıklıkla SRY genindeki mutasyonlardır. 46, XY Tam Gonadal Disgenez' li hastaların %10-20' sinde SRY geninde mutasyonlar saptanmıştır. SRY dışında WT-1, SF-1, SOX9 ve DAX-1 genlerinin etkilendiği durumlarda da 46, XY Tam Gonadal Disgenezi görülebilmektedir(4, 5, 6).

- **Miks Gonadal Disgenez**

Bir tarafta streak gonad, diğerk tarafta disgenetik ya da normal testis gelişimi vardır. Müllerian ve Wolffian kanal gelişimleri o tarafta bulunan gonadla paraleldir. Genotipik olarak sıklıkla 45,X /46,XY mozaik yapı görülürken, fenotipik olarak mozaiklik oranına bağılı olarak, kuşkulu genitalyadan normal erkek yada dişi görünümüne kadar değışkenlik vardır. Gonadal tümör gelişme riski artmıştır (5, 8).

2.2.3 Fenotipik Cinsiyet Gelişiminin Hastalıkları

Bu gruptaki hastalıklar cinsiyet kromozomlarıyla belirlenen cinsiyetin hormonların uygunsuz sentezine, defektif hedef hücre yanıtına ya da müllerian kanal regresyon problemlerine bağılı anormal fenotipik yansımalarını içermektedir.

- **Dişi Psödohermafroditizmi**

Genotipi XX, gonadları over, fakat dişi genital yapısı virilize olan hastalardır. Dişi psödohermafroditizminin en sık nedeni konjenital adrenal hiperplazidir.

Dişi Psödohermafroditizme yol açan Konjenital Adrenal Hiperplazi

Dişi Psödohermafroditizme yol açan Konjenital Adrenal Hiperplazi cinsel farklılaşma sırasında in utero aşırı androjen maruziyeti sonucu gelişir. 21-Hidroksilaz en sık olmakla birlikte *11 β -Hidroksilaz* ve *3 β -Hidroksisteroid Dehidrojenaz* eksikliği de dişi psödohermafroditizme yol açabilir (4, 5, 6).

Plasental Aromataz Eksikliği

Gebelik boyunca fetal ve maternal adrenal kaynaklı androjenlere maruz kalan plasenta bu androjenleri Plasental Aromataz aktivitesiyle östrojenlere dönüştürür. Plasental Aromataz Eksikliğinde dişi genotipli fetüste dış genital virilizasyon gelişebilmektedir (4, 5, 6).

- **Erkek Psödohermafroditizmi**

Genotipi XY, gonadları testis olan fakat dış genital yapısı ve fenotipi değişik derecelerde karşı cinse ait özellikler bulunduran hastalardır.

Erkek Psödohermafroditizme yol açan Konjenital Adrenal Hiperplazi ve Androjen Sentez Bozuklukları

Steroidojenik enzim sentezinin erken basamaklarındaki enzimlerin (P450_{scc}, 3 β -Hidroksisteroid Dehidrojenaz ve 17 α -Hidroksilaz) defektleri hem kortikosteroid hemde androjenik hormonların sentezini etkileyerek adrenal yetmezlik ve Erkek Psödohermafroditizm tablosu oluşturabilirler. Yine hormon sentezinin ilk basamağındaki Steroidojenik Akut Regülatör protein (StAR) eksikliği tüm basamakları etkileyerek androjen sentezini bozabilir. Bu enzimlerin eksiklikleri erkek psödohermafroditizme yol açan Konjenital Adrenal Hiperplazi nedenleridir.

17-Hidroksiprogesteron' un sonrasındaki androjenik sentez enzimlerinin (17,20-Liyaz ve 17-Hidroksisteroid Dehidrojenaz) defektleri de androjen yetersizliğine yol açabilmektedir. Bu iki enzim yalnızca gonadlarda aktif olduklarından adrenal yetersizlik bulguları olamadan erkek psödohermafroditizme yol açarlar. (4, 5, 6).

Leydig hücre Aplazisi/Hipoplazisi

Lüteinizan hormon (LH) reseptör mutasyonları sonucu gelişebilir. Erkek genotip ile tamamen dişi dış genital fenotip görülebilir. Gonadal disgenezidekinin aksine AMH üretimi normal olduğunda müllerian iç genital yapılar normal regrese olabilir.

Androjen Etkinliğinde Defekt Olan Durumlar:

5a-Redüktaz Eksikliği

Periferik dokularda Testesteron' dan Dihidrottestesteron dönüşümü yetersizdir. Dış genital yapı dişi fenotipte ya da “interseks” kuşkulu genital yapı görünümündedir. Erkek iç genital yapı normal gelişmiştir. Bu da Dihidrottestesteronun prostat ve dış genital yapının virilizasyonundaki özel rolünün bir kanıtıdır (6).

Androjen Reseptör Defektleri

Androjen reseptörünün tamamen fonksiyon kaybı “Komplet Androjen Duyarsızlığı Sendromuna” na (KAİS ya da Testiküler Feminizasyon) yol açar. Erkek genotipli bu hastalarda dış genital yapı tamamen dişidir, vajinal boşluk kısa ve kör sonlanmaktadır. Testisler normal boyuttadır ve abdomende, inguinal kanalda ya da labia majora içinde olabilir. İçeride Müllerian ve Wolffarian kanallar yoktur. Meme gelişim olur fakat tüylenme olmaz. Androjen resptöründeki daha hafif etkili mutasyonlar “Parsiyel Androjen İnsesitivite Sendromu” na yol açar, fenotip yetersiz virilizasyonla ilişkilidir. Sıklıkla jinekomasti gelişebilir (6).

2.3 Cinsel Gelişim Bozukluklarına Yaklaşım

Kuşkulu genital yapıyla doğan bir çocuğun tanısı hızlı ve multidisipliner yaklaşım gerektiren bir durumdur.

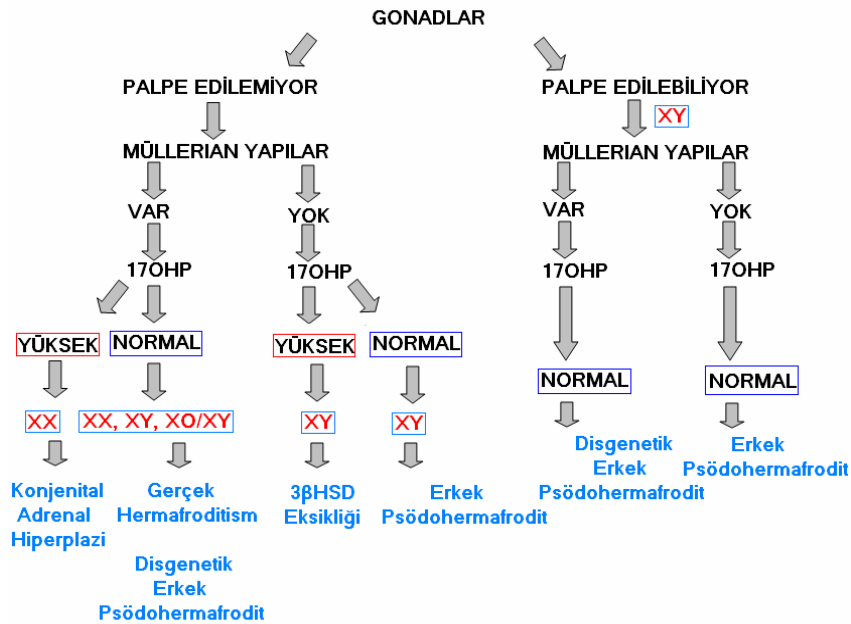
Yaklaşım detaylı bir aile ve gebelik öyküsüyle başlamalıdır. Hastalığın kalıtım biçimi açısından yönlendirici olabilecek, benzer etkilenmiş başka aile üyelerinin varlığı sorgulanmalıdır. Annenin gebelikte, özellikle ilk 3 ayda maruz kaldığı ilaçlar, alkol ve hormonlar dikkatli sorgulanmalıdır.

Etkilenmiş yenidoğanın fizik muayenesinde ek anomaliler ve dismorfik özellikler dikkatli incelenmeli, saptanan kuşkulu genital yapının bir sendromun ya da bir kromozomal anomalinin parçası olabileceği unutulmamalıdır. Penis ve klitoris ölçümleri yapılmalıdır, üretral açıklığın yeri saptanmalı, tek ortak açıklık olasılığı göz ardı edilmemelidir. Labioskrotal kıvrımlar hem füzyon açısından hem de barındırabildikleri gonad dokusu açısından değerlendirilmelidir. Benzer şekilde inguinal

kanal palpasyonu da gonad varlığını gösterilebilmesi açısından önemlidir. Gonad palpasyonunda epididimis varlığına dikkat edilmelidir.

Konjenital adrenal Hiperplazi kuşkulu genital yapıya sahip bir yenidoğanda her zaman akılda tutulmalıdır. Standart tanısal testler bazal serum 17-OHP seviyelerini, Kortizol, ACTH, Testesteron ve DHEA-S seviyelerini, ACTH uyarısı sonrası serum 17-OHP seviyelerini içermelidir. Dişi Psödohermafroditizminin en sık nedeni olan 21-Hidroksilaz eksikliğine bağlı Konjenital Adrenal Hiperplazi’ de görülen tuz kaybı ve öldürücü olabilen adrenal kriz açısından serum elektrolit seviyeleri denetlenmelidir (3, 7, 14).

Hastalığı etyolojisinin aydınlatılmasında kromozom ve FISH analizleri, abdominal ultrasonografi, ilk basamakta uygulanmalıdır. Sonraki basamakta gereğinde, 46,XX yenidoğanlarda iç genitoüriner anatomiye incelemek için kontrastlı radyolojik tetkikler uygulanabilmektedir. 46,XY yenidoğanda 5 α -Redüktaz eksikliği açısından hCG uyarı testi kullanılabilmektedir (3) (Şekil 3).

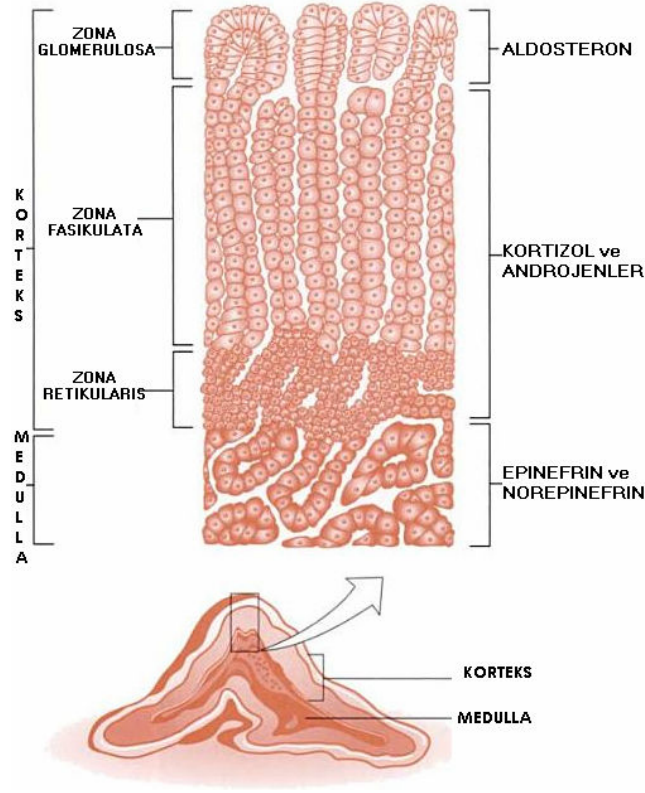


Şekil 3. Kuşkulu genital yapıya yaklaşım (Shah ve Sujit’ den değiştirilerek alınmıştır) (7)

2.4 Adrenal Bez

2.4.1 Adrenal Bez Gelişimi

Böbreküstü bezleri böbrek üst pollerinde yerleşmiştir ve her biri yaklaşık 8 gr ağırlığındadır. Her bir bez 2 farklı bölümden oluşmuştur (Şekil 4) . İç kısımda bezin %10-20' sini oluşturan Medulla' dan sempatik sinir sistemi etkisi ile Epinefrin ve Norepinefrin salgılanır. Korteks bölgesinden ise tümü kolesterolden sentezlenen kimyasal yapıları çok benzer fakat fonksiyonları çok farklı olan Kortikosteroid hormonları sentezlenir. Adrenal bez korteksi embryonik hayatta 4. haftada kölomik epitelyum kaynaklı mezodermden gelişir. 4-10 haftalar arası bu kölomik epitelyum hücreleri çoğalır göç eder ve 2 farklı zon ortaya çıkar. İç fetal zon ve dış belirleyici korteks olarak ayrılan bezin korteksinin %90'ı iç fetal zondadır. Adrenal büyüme ve remodelling 10. hafta civarı başlar doğumdan sonra 1. yıla kadar sürebilir. 28-30. haftalarda Zona Glomerulosa, Zona Fasikülata, Fetal korteks ve medulla bellidir. Doğumdan kısa süre sonra fetal korteks atrofiyle kaybolur. Fetal adrenal gelişiminde endokrin parakrin ve otokrin faktörler etkilidir. Fetal hipofiz kaynaklı ACTH ve lokal adrenal büyüme faktörleri [basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alfa (TGF- α), insuline like growth factor 1 ve 2 (IGF-1/2), transforming growth factor beta (TGF- β), Steroidojenik Faktör -1 (SF-1), dosage sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region (DAX-1) ve östrojen reseptörü (ER)] önemli rol oynar. SF-1 bir doku ve hücre spesifik orphan nükleer reseptördür ve steroidojenik enzimler de dahil birçok enzimin transkripsiyonel regülatörüdür. Yapılan çalışmalarda SF-1 distrüpsiyonunun yenidoğan farelerde adrenal agenezisine yol açtığı gösterilmiştir. DAX-1 de benzer şekilde bir orphan nükleer reseptördür ve insanda DAX-1 mutasyon ya da delesyonlarının sonucunda X'e bağlı Adrenal Hipoplazi ya da Hipogonadotropik Hipogonadizm ortaya çıkmaktadır. Adrenal gelişimde uyarıcı diğer bir faktör olan ACTH' ın önemi de büyüktür. Yapılan çalışmalarda anensefali gibi ACTH yokluğu durumlarında, fetal adrenal bezlerin 2. trimestrda gerilemiş olduğu gözlenmiştir (4, 8, 9).



Şekil 4. Adrenal bez (Molina ve ark. dan değiştirilerek alınmıştır) (8).

2.4.2 Fetal Adrenal Steroidogenez

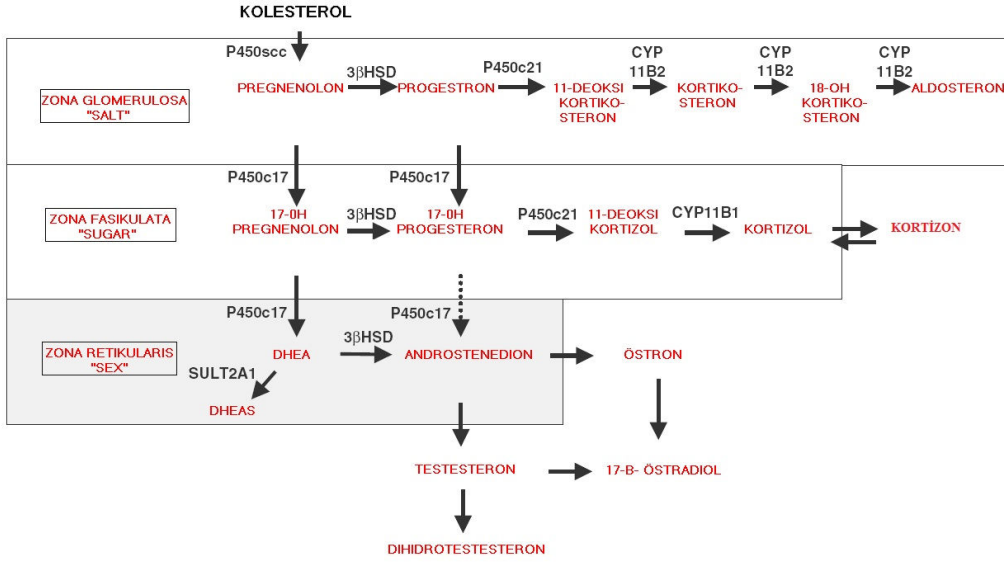
Fetoplasental ünite, fetal adrenal, plasental ve maternal steroidogenez arasındaki kompleks koordinasyonu yönetmektedir. Fetal adrenaller 6-8. haftalarda steroidogeneze başlamaktadır. Hipotalomo-hipofizer-adrenal aks ise 10. haftada “feedback” özelliğini kazanmaktadır. Bunun bir göstergesi olarak Konjenital Adrenal Hiperplazili kız fetüslerdeki intrauterin “ambiguous” genitalya gelişimi örnek verilmektedir. 6-8. haftalarda steroidler fonksiyonel korteks olan fetal zondan salgılanmaya başlar. Bu steroidler aynı zamanda karaciğer için DHEA-S kaynağını oluşturur, ki bu da, 16 α -hidroksilasyonla 16 α -DHEA-S üretimini sağlar. 16 α -DHEAS’ dan plasentada fetal

canlılığın göstergelerinden östriol üretilir. Gebeliğin son dönemlerinde bu plasental östrojen fetal adrenal bezin steroid biyosentezini uyarır. Bu uyarı fetüsün akciğer, karaciğer, tiroid ve barsaklar gibi hayati organlarının matürasyonu için gerekli kortizoli sentezlemesini sağlar. Fetoplasental östrojenin fetal steroidogenez dışında gebelik devamlılığında sağlanmasında, maternal kardiovasküler sistem regülasyonunda, uteroplental kan akımı düzenlenmesinde ve progesteron ilişkili immunsupresyonda da etkileri vardır (8).

2.4.3 Adrenal Steroidogenez

Adrenal korteks morfolojik olarak 3 zona ayrılmıştır. Bu 3 zon aynı zamanda farklı hormonların sentezinden sorumludur. Bu üç grup hormon Glukokortikoidler (Kortizol ve kortikosteron), Minerakortikoidler (Aldosteron ve deoksikortikosteron) ve seks steroidleri (DHEA ve androstenedion) ‘nden oluşmaktadır (Şekil 4). Adrenal hormonların tamamı kolesterol kaynaklıdır ve kandan özellikle düşük dansiteli lipoproteinlerden (LDL) endositozla absorbe edilirler. Endositozla alınan veziküller lizozimlerle birleştirilir kolesterol esteraz ile hidrolize edilir ve serbest kolesterol elde edilir. Alternatif kolesterol kaynağı olarak adrenal bez korteksinde Asetil Koenzim A ‘dan kolesterol sentezlenebilir. Ayrıca adrenal bez SR-B1 isimli özel HDL reseptörleri sayesinde HDL ‘den de kolesterol alabilir (8).

Hormon sentezinin ilk adımında intrasellüler kolesterol dış mitokondrial membrandan iç mitokondrial membrana “Steroidojenik Acute Regulatory Protein” (StAR) vasıtasıyla transport edilir. Bu basamak steroid sentezinde hız-kısıtlayıcı basamak olarak kabul edilmektedir. ACTH’ ın kendi reseptörüne bağlanmasıyla artan hücre içi cAMP, StAR aktivitesini regüle etmektedir. Transport edilen kolesterol tüm steroidojenik hücrelerin iç mitokondrial membranlarında bulunan “Sitokrom P450 Side Chain Cleavage” (P450_{sc} ya da CYP11A ya da Cholesterol Desmolase) enzim etkisi ile pregnenolona çevrilir. Bu reaksiyon sonucu ortaya çıkan pregnenolon bundan sonra gelecek bir dizi enzimatik reaksiyonun sübstratıdır. Adrenal korteksin farklı kısımlarını özgün enzimatik özellikleri olan farklı hücre grupları oluşturduğundan, sentez yolu, reaksiyonun sürdüğü korteks bölgesine özgün mineralokortikoid, glukokortikoid ya da androjenik hormon üretimi tercihi ile sonlanır (8, 9, 10, 11, 13, 14).



Şekil 5. Steroid biyosentezinin yolları

Glukokortikoid Hormon Sentezi

Glukokortikoidlerden kortizolu ve kortikosteronu zona fasikülata ve zona retikularis hücreleri sentezler.

Mitokondrideki Pregnenolon **Progesteron** ya da **17 α -OH-Prenenolon**' a çevrilir.

- Pregnenolon' dan **17 α -OH-Pregnenolon**' a dönüşüm *17 α -Hidroksilaz*' la olurken, **17 α -OH-Pregnenolon**' dan **17 α -OH-Progesteron**' a dönüşüm *3 β -Hidroksisteroid Dehidrogenaz* ile olur. **17 α -OH-Progesteron** **11-Deoksikortizol**' e ya da **Andostenedion**' a çevrilebilir. **17 α -OH-Progesteron**' dan **11-Deoksikortizol**' dönüşümünü *21 β -Hidroksilaz* sağlar ki bu da hemen *11 β -Hidroksilaz* ile kortizole dönüştürülebilir. **17 α -OH-Progesteron**' dan **Andostenedion**' a dönüşümü *17,20-Liyaz* sağlar. **17 α -OH-Prenenolon** ve **17 α -OH-Progesteron** *17,20-Liyaz* ile sırasıyla **DHEA** ya da **Androstenediaon**' dönüştürülebilir. Ayrıca **DHEA**' da **Androstenediaon**' a *3 β -Hidroksisteroid Dehidrogenaz* enzimiyle dönüştürülebilir (Şekil 5).

- Prenenolon’ dan Progesteron çevrimi *3 β -Hidroksisteroid Dehidrogenaz* enzimiyle olur. **Progesteron** ise *21 β -Hidroksilaz* enzimi ile **11-Deoksikortikosteron** ‘ a çevrilir. Daha sonra **11-Deoksikortikosteron (DOC)** *11 β -Hidroksilaz (b2)* ile **Kortikosteron’** a dönüştürülür (Şekil 5).

Mineralokortikoid Hormon Sentezi

Adrenal Zona Glomerulosa hücreleri öncelikle ve tercihan mineralokortikoid sentezi yaparlar. Bu hücrelerde *17 α -Hidroksilaz* aktivitesi yoktur bu nedenle burada **Prenenolon** sadece **Progesteron’** a çevirilebilir. *11 β -Hidroksilaz* aktivitesi de olmayan bu hücrelerde **11-Deoksikortikosteron** **Kortikosteron’** a *11 β -Hidroksilaz* ile dönüştürülemez. Fakat bu hücrelere özgü *Aldosteron Sentaz* enzimi yardımıyla **11-Deoksikortikosteron**, önce **Kortikosterona** sonra **17-OH kortikosteron’** a ve son olarak **Aldosteron’** a dönüştürülebilir (Şekil 5).

Adrenal Androjen Hormon Sentezi

Kortizolden DHEA sentezi glukokortikoid ve mineralokortikoidlerdekine benzer olarak gerçekleşmektedir. İlk enzimatik çevrim ürünü olan **Pregnanolon** P450c17 mikrozomal enziminin *17 α -Hidroksilasyon* ve *17,20-Liyaz* aktiviteleriyle **DHEA’** a dönüştürülür (Şekil 5).

2.4.4 Adrenal Steroidlerin Etkileri

- **Glukokortikoidler**

Kortizol : Tüm glukokortikoid aktivitenin %95’ indan sorumludur.

Kortikosteron : Tüm glukokortikoid aktivitenin %4’ ünden sorumludur.

Glukokortikoidlerin etkileri

Glukokortikoid hormonlar, karbonhidrat metabolizmasında glikoneogenezin (protein ve diğer bazı maddelerden karbonhidrat sentezi) uyarılmasına, glikoz kullanımının azalmasına ve kan glukoz konsantrasyonunda artışa neden olurlar. Protein

Metabolizmasında ise protein depolarında azalma, katabolizma artışı ve kan aminoasit konsantrasyonunda artışa neden olurlar. Glukokortikoidlerin yağ metabolizmasındaki etkileri yağ asitlerinin mobilizasyonunun artış ve kan yağ asidi konsantrasyonunda artış ile sınırlıdır . İnflamasyonda anti-inflamatuar etkileri vardır (9).

- **Mineralokortikoidler**

Aldosteron : Tüm mineralokortikoid aktivitenin %90' ından sorumludur.

Dezoksikortikosteron : Aldosteronun %6-8' i oranında güçlüdür.

Kortikosteron : Hafif mineralokortikoid etkilidir.

Kortizol : Mineralokortikoid etkisi aldosterona göre çok az fakat önemli bir mineralokortikoid etkisi mevcuttur.

Mineralokortikoidlerin etkileri

Mineralokortikoidlerin yokluğunda ekstrasellüler sıvıda potasyum konsantrasyonu belirgin derecede artarken sodyum ve klor konsantrasyonları azalır. Total ekstrasellüler sıvı ve kan hacmi belirgin azalır şok tablosu gelişir. Bu tabloyu önlemede esas görevi hormon %90' lık payı ile aldosterondur. Kortizolün mineralokortikoid etkisi aldosteronun 1/400 ' ü oranında olsa da aldosterona göre 80 kat fazla salınması kortizolü de önemli bir role taşımaktadır (9).

- **Adrenal Androjenler**

DHEA

DHEA-S

Androstenedion

Adrenal Androjenlerin etkileri

Özellikle fetal hayatta önemi bulunan adrenal androjenler, normal koşullarda insanda zayıf etkiye sahiptirler. Erkek seks organlarının gelişiminde etkileri vardır fakat dışında hafif etki göstermektedir. DHEA ve DHEAS' tan testosteron dönüşümü çok azdır. Zona retikularisin gelişimi ve adrenal androjenlerin yaşla artması sonucu 5-8 yaş civarında Adrenarj ismi verilen koltukaltı ve genital kıllanma başlar (3).

2.4.5 Adrenal Steroidlerin Salınımın Kontrolü

Adrenal bezde aldosteron salınımını uyaran faktörler “Zona Glomerulosa” da hipertrofiye neden olabilirken, diğer tabakalar üzerinde etkisizdirler. Benzer şekilde kortizol ve adrenal androjenlerin salınımını uyaran faktörler de “Zona Fasikülata” ve “Zona Retikularis” üzerinde hipertrofik etkide bulunabilirken “Zona Glomerulosa” ya etkisizdir. Bunun nedeni “Zona Glomerulosa” dan salgılanan mineralokortikoidlerin Renin-Anjiotensin sistemi kontrolündeyken, “Zona Fasikülata” ve “Zona Retikularis” den salgılanan steroid hormonların hipotalamo-hipofizer aksın kontrolünde olmasıdır. Hipofiz kaynaklı Adrenokortikotropik hormon (ACTH) kortizol salınımını kontrol eden temel faktördür. ACTH’ ı ise hipotalamustan salınan kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH) kontrol eder. Fiziki ya da mental stres, doku zedelenmesi ve ağrı gibi faktörlerle önce beyin sapına oradan median eminensiya ulaşan uyarılar CRH salınımına dolayısıyla ACTH salınımına neden olur. Hızla artan kortizol konsantrasyonları direkt olarak ön hipofizde “negatif feedback” ile ACTH salınımını baskılayıcı etki gösterir. Bu noktada dikkati çeken ACTH’ ın uyarıcı faktörlerle ya da düşük kan kortizol konsantrasyonlarıyla salınımının arttığı durumlarda adrenal bez üzerinde “pozitif feedback” etkisiyle adrenal androjenlerin salınımının da arttırmasıdır (8).

2.5 Konjenital Adrenal Hiperplazi

Konjenital adrenal hiperplazi kortizol sentezinde görevli enzimlerden birinin aktivitesindeki yetersizlik sonucu ile ortaya çıkan otozomal resesif bir hastalık grubudur. Kortizol sentezindeki defekt sonucu ortadan kalkan “negatif feedback” ACTH salınımını arttırır, adrenal bezde hiperplazi oluşur ve adrenal steroidlerin aşırı salınımı ortaya çıkar. Biyokimyasal belirleyiciler ve klinik semptomlar hangi steroidin eksik ve hangilerinin aşırı üretildiğine göre değişkenlik gösterir ama genel olarak, konjenital adrenal hiperplazide karakteristik özellik şüpheli genital yapı ve bozulmuş cinsel gelişimdir. XX genotipli bir yenidoğan *21-Hidroksilaz* ve *11 β -Hidroksilaz* enzim eksikliklerinden dış genital yapıdaki aşırı virilizasyonla etkilenirken, XY genotipli bir yenidoğan *17 α -Hidroksilaz* ve *3 β -Hidroksisteroid Dehidrogenaz Tip-2* eksikliğinden dış genital yapıdaki yetersiz virilizasyonla etkilenir. *P450 Oksidoredüktaz* Eksikliği (ORD) doğumda her iki cinsiyeti de etkileyebilecek tek tip KAH’ dır. Aşırı

virilize XX yenidoğana neden olabileceği gibi yetersiz virilize XY yenidoğana da neden olabilir. Ayrıca ORD iskelet sistemi bulgularıyla kendini gösterebilecek tek KAH varyantıdır (8, 11, 16).

2.5.1 11 β -Hidroksilaz Enzim Eksikliğine Bağlı Gelişen KAH (OMIM +202010)

Tüm KAH vakarlarının %5-8' ini oluşturur. Otozomal resesif olarak kalıtılır. İnsidansı yaklaşık 100.000 canlı doğumda 1' dir (18).

11 β -Hidroksilaz enzimi kortizol sentezinin son basamağında 11-Deoksikortizol' u Kortizole' e dönüştürür. Ayrıca 11-Deoksikortikosteron' dan Kortikosteron dönüşümünde de katalizleyici etkisi vardır. Bu enzimin yetersizliği sonucunda kortizol sentezi azalırken, 11-Deoksikortizol ve 11-Deoksikortikosteron birikimi olur. Biriken bu ara metabolitler sırasıyla glukokortikoid ve mineralokortikoid öncülleridirler. Mineralokortikoid etkili 11-Deoksikortikosteron' un mineralokortikoid reseptörünü aktive etmesi sonucu bu tip KAH için tipik olan hipertansiyon ortaya çıkar. Yine bu metabolilerin androjen sentez yoluna kayması sonucu; ağır virilize 46,XX yenidoğanlar ve erken puberte ile karşımıza gelen 46,XY çocuklar görülür.

11 β -Hidroksilaz enziminin geni 8q21' de yerleşmiş olan **CYP11B1**' dir. Gendeki mutasyonlar çoğunlukla klasik tip hastalıkla sonuçlanmaktadır (6, 11,13, 16, 18).

2.5.2 17 α -Hidroksilaz Enzim Eksikliğine Bağlı Gelişen KAH (OMIM #202110)

Nadir görülen, KAH vakalarının % 1' inden sorumlu bir enzim eksikliğidir. Otozomal resesif olarak kalıtılır. İnsidansının yaklaşık 50.000 canlı doğumda 1' olduğu düşünülmektedir.

*17 α -Hidroksilaz çift enzimatik etkinliğe sahiptir. 17 α -Hidroksilasyon etkisiyle Pregnenolon' dan **17 α -OH-Pregnenolon'** a ve Progesteron' dan **17 α -OH-Progestron** dönüşümüne gerçekleştirir. Ayrıca 17,20-Liyaz etkisiyle **17 α -OH-Pregnenolon** ve **17 α -OH-Progesteron** sırasıyla **DHEA ve Androstenedion'** dönüştürülebilir. İkili enzimatik etkinin yetersizliği sonucunda glukokortikoid ve seks steroid yetersizliği; mineralokortikoid prekürsör (11-Deoksikortikosteron, Kortikosteron) birikimi sonucu mineralokortikoid fazlalığı ortaya çıkar. Klinikte hipokalemik hipertansiyon tipiktir. 17,20-Liyaz etkisindeki yetersizlik sonucu ise*

yetersiz virilize 46,XY yenidoğanlar ile primer amenore' li 46,XX hastalar görülür. Her iki cinsiyette yetersiz pubertal gelişim ve hipergonadotropik hipogonadizm vardır.

17 α –Hidroksilaz enziminin geni **CYP17A1**' dir. Bu gendeki mutasyonlar *17 α -Hidroksilaz* enzim eksikliğine yol açabilmektedir. Nadiren CYP17A1 molekülünün kofaktör sitokrom b5 ile ilişkide olduğu noktada meydana gelen mutasyonlar izole *17,20-Liyaz* enzim eksikliğine neden olabilmektedir (6, 11,13, 16, 18).

2.5.3 3 β -Hidroksisteroid Dehidrogenaz Tip-2 Enzim Eksikliğine Bağlı KAH (OMIM +201810)

KAH tipleri içinde nadir görülen bir varyanttır. KAH vakalarının % 1' inden azından sorumlu bir enzim eksikliğidir. *3 β -Hidroksisteroid Dehidrogenaz Tip-2 (HSD3B2)* 3 farklı steroidojenik reaksiyonda görev alır. Prenenolon' dan Progesteron, *17 α -OH-Pregnenolon*' dan *17 α -OH-Progesteron* ve DHEA' dan Androstenediaon *3 β -Hidroksisteroid Dehidrogenaz* enzimiyle oluşturulur. 3 grup steroidojenik hormon üretimi de etkilendiğinden çok geniş ve değişken çerçeveli bir klinik ortaya çıkar. Hastalık ağır tuz kaybettirenden tuz kaybettirmeyene; yenidoğanda erkeklerde yetersiz virilize dış genital yapıdan, erkek ve dişide erken puberteye ve hatta pubertede menstrual düzensizlik ve hirsutisme kadar farklı şekillerde kendini gösterebilir.

3 β -Hidroksisteroid Dehidrogenaz eksikliği, *HSD3B2* genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkar (6, 11,13, 16).

2.5.4 P450 Oksidoredüktaz Eksikliğine (ORD) bağlı KAH (OMIM #201750)

P450 Oksidoredüktaz otozomal resesif kalıtımla geçen bir hastalıktır.

P450 Oksidoredüktaz enzimi (POR) *17 α –Hidroksilaz* (CYP17A1) ve *21 –Hidroksilaz* (CYP21A2) enzimlerine elektron vericisi olarak görev yapan bir enzimdir. Dolayısıyla POR enzim eksikliği sonucu hem *17 α –Hidroksilaz* hemde *21 –Hidroksilaz* enzimlerinin fonksiyonları etkilenir. Klinikte de her iki cinsiyetli hastaların da cinsel gelişim problemleri açısından etkilendikleri gözlenebilir. Ağır virilize 46,XX vakalar olabildiği gibi yetersiz virilize 46,XY vakalar da vardır. *17 α –Hidroksilaz* ve *21 –Hidroksilaz* eksikliklerinden farklı olarak prenatal androjen fazlalığından etkilenmiş olan yenidoğanlar, hiperandrojenizmin postnatal etkilerini göstermezler. ORD' nin diğer bir dikkat çekici özelliği diğer hiçbir KAH tipinde olmayan kranio-fasial

malformasyonlardır. Bunlardan bazıları; brakisefali, mikrosefali, yonca yaprağı şekilli kafatası, midface hipoplazisi, hipertelorizm, vertebral defektler, uzun kemik eğrilikleri ve kırıkları, sinostozlar şeklinde sıralanabilir (6, 11,13, 16).

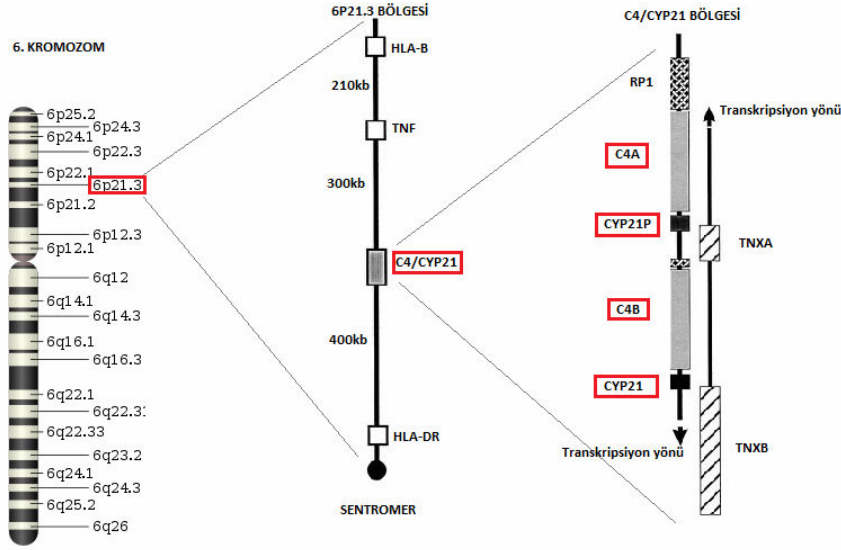
2.5.5 StAR Eksikliğine bağlı Konjenital Lipoid Adrenal Hiperplazi (OMIM #201710)

Steroid hormon sentezinin tüm basamakları kolesterolün mitokondri içindeki steroidojenik komplekse verilmesini gerektirir. Bu görevi Steroidojenik Akut regülatör protein (StAR) gerçekleştirir. StAR ayrıca Kolesterol'den Pregnonolon dönüşümünü de sağlamaktadır. StAR geninin mutasyonları nadir görülen Konjenital Lipoid Adrenal Hiperplazi' ye yol açar. Otozomal resesif kalıtılır.

StAr-bağımsız steroidogenez glukokortikoid yetersizliğini belli bir oranda kapatabilmektedir. Bu nedenle etkilenmiş yenidoğanlarda mineralokortikoid eksikliği bulguları ön plandadır. Ayrıca etkilenmiş erkek çocuklar ileri derecede yetersiz virilize dış genitalyaya sahiptirler. Dişilerde genital farklılaşma spontan feminizasyonla sürdüğünden fenotipik olarak StAr eksikliğinden etkilenmemiş görünürler. Tüm vakalarda tuz kaybı vardır ve tedavi edilmezlerse sıklıkla ölümcüldür. Adrenal bezler görüntülendiğinde hiperplazik oldukları ve kolesterol kaynaklı lipid dolu globüller içerdikleri görülür. Gonadlarda da biriken kolesterol ve esterleri hem erkek hemde dişide gonad hücrelerinin hasarına neden olur (6, 11, 13, 16).

2.5.6 21-Hidroksilaz Eksikliğine Bağlı Konjenital Adrenal Hiperplazi

Kuşkulu genital yapının en sık nedeni Konjenital Adrenal Hiperplazi iken, KAH' nin en sık nedeni %90-95' lik bir oranla 21-Hidroksilaz eksikliğidir (3, 6, 11, 13, 14, 16). Hastalık 6p21.3' de yerleşmiş olan CYP21A2 genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Otozomal resesif kalıtılır. Hastalığın sıklığı klasik formda yaklaşık 15.000 canlı doğumda 1 iken, daha hafif formlarda 1000 canlı doğumda 1' e kadar çıkar (14).



Şekil 6. CYP21 geni ve 6p21.3 bölgesindeki yerleşimi

21-Hidroksilaz **Progesteron'** dan **11-Deoksikortikosteron** ve **17 α -OH-Progesteron'** dan **11-Deoksikortizol** üretilmesini sağlar (Şekil 5). Hastalığın, enzim aktivitesiyle paralel seyreden Klasik (Ağır) ve Non-Klasik (Hafif) formları vardır. *Klasik* formda etkilenmiş dişi virilizasyonu in utero olarak başlar. *Non-Klasik* formda ise androjen fazlalığının etkileri geç çocuklukta, pubertede ya da postpubertal bulgu vermeye başlar. Enzim defekti nedeniyle biriken ve serumda yükselen prekürsörlerden **17 α -OH-Progesteron** hastalığın tanısında da kullanılan bir belirteçtir. Bazal serum **17 α -OH-Progesteron (17-OHP)** seviyeleri genellikle 10.000 ng/dl 'nin üzerindedir. Tanıda kullanırken dikkat edilmesi gereken bir nokta ağır etkilenmiş de olsa yenidoğanın ilk birkaç günde yüksek **17 α -OH-Progesteron** seviyeleri göstermeyebildiğidir. ACTH uyarımı sonrası ölçülen 17-OHP seviyeleri ağır etkilenmiş tuz kaybettiren tipli hastalarda 100.000 ng/dl seviyelerine kadar çıkabilir. Genellikle basit virilizan tipte daha düşük seviyeler beklense de ağır vakaların seviyeleri ile örtüşen değerler görülebilir (3). Non-Klasik formdan etkilenmiş hastalar özellikle yenidoğan döneminde düşük 17-OHP seviyeleri gösterirler. Klasik ve non-klasik mutasyonları birleşik heterozigot olarak taşıyan hastalar, non-klasik mutasyonları homozigot taşıyanlara göre daha yüksek ACTH ile uyarılmış 17-OHP seviyeleri gösterirler. Heterozigot taşıyıcılar için 17-OHP ölçümleri bir belirteç olarak çok hassas değildir. Yapılan çalışmalarda ACTH ile uyarılmış 17-OHP ölçümü yapılan

heterozigotların ancak %50' si genotip olarak normal kişilerden ayırt edilebilmiştir. Progesteron ve Androstenedion' da serumda artmıştır. Ayrıca 21-Hidroksilaz eksikliğinde serum seviyeleri karakteristik olarak artan bir diğer anormal steroid 21-deoksikortizol' dür (3, 14, 16).

21-Hidroksilaz Eksikliğine Bağlı Klasik Tip KAH' da Fenotip

Ortaya çıkan prekürsörlerin androjenik yollara kayması 21-Hidroksilaz eksikliği (21-OHD) olan hasta için prenatal dönemde başlayan bir androjenik yük getirmektedir. Bu androjen fazlalığı erkek fetüslerin cinsel gelişiminde ciddi bir etki getirmezken, dişi fetüste virilizasyona yol açmaktadır. Fetal adrenal bezlerin 6-8. haftalarda enzim sentezine başlamaları; bu dönemde vajinal ve üretral kanallara ayrılma aşamasına geçmiş olan ürogenital sinüste ayırlamamaya neden olabileceği gibi androjene hassas klitoris dokusunda genişleme, labial kıvrıntılarda birleşme ve vajinal/üretral kanal açıklığının rostrale kayması gibi etkilerde de bulunabilmektedir. 12. haftada vajina ürogenital sinüsten ayrıldığından bu dönemden sonra androjen maruziyeti yalnızca kliteromegaliye neden olabilmektedir. Etkilenmiş dişi fetüs tipik olarak, kuşkulu genital yapıyla ya da hipospadiaslı ve inmemiş testisli erkeğe benzer görünümlü dış genitalya ile doğmaktadır.

Progesterondan Aldosterona ilerleyen sentez yolundaki defekt nedeniyle klasik KAH hastalarının 4' te 3' ü yeterli seviyede aldosteron üretemezler. Ekstrasellüler sıvıda potasyum konsantrasyonu belirgin derecede artar, sodyum ve klor konsantrasyonları azalır. Total ekstrasellüler sıvı ve kan hacmi belirgin azalır. Şok tablosu gelişebilir. 21-OHD' de tuz kaybı olan yenidoğanların hızla kaybedilme riskinde aldosteron yetersizliği yanı sıra kortizol yetersizliğinin de katkısı vardır. Tedavi edilmemiş vakalar doğumun ardından 1-4 hafta içinde hiponatremi-hiperkalemi ve hipovolemik şokla, "Adrenal Kriz" ile kaybedilebilir.

Enzim aktivitesindeki kayıp oranına bağlı olarak mineralokortikoid üretiminin çok etkilenmediği, androjen fazlalığının etkilerinin ön planda olduğu durumlarda fenotip, **Basit Virilizan Tip** olarak tanımlanmaktadır. Hem androjen fazlalığı etkileri hemde mineralokortikoid yetersizliği bulguları ön planda olan hastalar **Tuz Kaybettiren Tip** fenotip ile ilişkilidirler.

Sürmekte olan androjen fazlalığı tam tedavi edilmemiş hastalarda postnatal etkilere yol açabilir. Erkeklerde hızlanmış lineer büyüme, pubik kıllanma, penis büyüklüğünde artış ve testiküler genişleme görülebilir. Dişilerde ise klitoral genişleme, adelösan dönemde akne, ovarian disfonksiyon ve tüylenme artışı görülebilir.

KAH hastası olan bayanlarda geç menarj, düzensiz menstrüel sikluslar ve polikistik over hastalığı benzeri bulgular üreme sorunlarına yol açabilmektedir. KAH hastalarının gebeliğinde, artmış maternal androjenlere rağmen etkilenmemiş diş fetüste plasental aromatazlar sayesinde virilizasyon görülmemektedir. KAH hastası erkeklerde ise belirgin bir üreme problemi beklenmemekle birlikte nadiren Non-Klasik erkek KAH hastalarında infertilite vakaları bildirilmiştir.

21-Hidroksilaz Eksikliğine Bağlı Non-Klasik Tip KAH'da Fenotip

Kuşkulu genital yapıyla doğmayan fakat postnatal androjen fazlalığından etkilenen hastalar Non-klasik hasta grubunu oluşturmaktadır. ACTH uyarısı sonrası 17-OHP seviyeleri 100.000ng/dl' ye ulaşabilen Klasik KAH hastaları ile 17-OHP seviyeleri normal sınırlarda kalabilen heterozigot' ların tanınması göreceli olarak kolayken, Non-Klasik hastaların normale yakın 17-OHP yanıtları tanıyı güçleştirmektedir. Dişiler Non-Klasik hastalıktan adet düzensilikleri, tüylenme artışı, akne ve erken pubarj gibi bulgularla daha fazla etkilenmektedir. Erkeklerde görülebilen akne ve infertilite ise çoğu zaman asemptomatik olan bu bireylerdeki nadir bulgulardır. Hastalardaki hafif ya da asemptomatik seyir ve laboratuvar bulgularındaki siliklik tanıyı güçleştirdiği gibi insidansının belirlenmesini de güçleştirmektedir. Genel popülasyonda hastalık frekansı % 0.1 olarak öngörülmektedir (14).

21-Hidroksilaz Eksikliğine Bağlı Konjenital Adrenal Hiperplazi' nin Etyopatogenezi

Steroid 21-Hidroksilaz (P450c21), CYP21 (CYP21B ya da CYP21A2) geni tarafından kodlanan bir mikrozomal sitokrom p450 enzimidir. 6. kromozom kısa kolunda 21.3 bölgesinde yerleşmiştir, yaklaşık 2 centriMorgan mesafesindeki HLA kompleksi ile sıkı bağlantı özellikleri taşımaktadır (Şekil 6). 494 amino asidin

kodlandığı 10 ekzonluk genin 3.3 kb' lık dizisi ve 2 kb' lık cDNA' sı yaklaşık 52kDa' luk bir protein kodlar.

1984 yılında CYP21 geni klonlandığında CYP21 geninin serum komplemanı C4 içinde yerleştiği saptanmıştır (20). Yapılan çalışmalar sonucu CYP21 ve C4 genlerinin bulunduğu kromozomal bölgenin duplike olarak CYP21' in ve C4' ün izoformlarının (CYP21P ve C5) ortaya çıkmış oldukları anlaşılmıştır. Dizi ve protein analiz çalışmaları bir CYP21 izoformunun (CYP21P) sentezi kesintiye uğramış (truncated) ve fonksiyonel olmayan ürünle sonuçlandığını göstermiş, bundan sonra da bu izoforma psödogen (CYP21P, CYP21A1P ya da CYP21A) tanımlaması yapılmıştır. CYP21P' nin tamamen kayıp olduğu ailelerde yapılan çalışmalar bu genin tümüyle fonksiyonsuz olduğunu kanıtlamıştır. CYP21 ve CYP21P' nin yaklaşık %98 dizi homolojisine sahip olması ve yaklaşık 30 kb' lık bir mesafede yerleşmelerinin sonucu olarak mayozda kromatidlerin yanlış eşleşmeleri ve “Unequal Crossing-over“ olayları yaşanabilmektedir. Bunun sonucu olarak da gende delesyonlar ve duplikasyonlar meydana gelebilmektedir. Çoğu 21-Hidroksilaz Eksikliği hastaları CYP21P geninde bulunan mutasyonları CYP21 geninde de taşımaktadır. Bu durumu açıklamada CYP21P geninden homolog yerleşimdeki CYP21 genine “gen konversiyonu” ile mutasyonların aktarılması mekanizması öne sürülmektedir (3, 19, 25).

CYP21 genininin zona fasikülatadaki ekspresyonunu temel etkileyen faktör ACTH' dir. ACTH uyarımı cAMP vasıtasıyla transkripsiyonun artımına neden olmaktadır.

21-Hidroksilaz eksikliği otozomal resesif şekilde geçen bir monogenik hastalık olduğundan ve HLA kompleksi ile sıkı bağlantı içinde olduğundan 21-OHD olan kardeşler nerdeyse her zaman aynı HLA yapısına da sahiptirler. İki ya da daha fazla lokustaki allellerin rastgele olmayan ilişkisini tanımlayan “bağlantı eşitsizliği” ilkesi, çeşitli 21-OHD formlarıyla çeşitli HLA tipleri arasındaki ilişkide de geçerlidir. CYP21 geninin klonlanmasından önce prenatal tanıda HLA haplotiplemesi sık kullanılan bir yöntem olmuştur. Tuz kaybettiren tip hastalık ile HLA-A3, HLA-Bw47 ve HLA-DR7 birlikteliği; non-klasik tip hastalık ile HLA-B14, HLA-DR1 birlikteliği bağlantı ilkeleri doğrultusunda dağılan allellerin etkileyici bir kanıtıdır. Yine HLA-A1, HLA-B8 ve HLA-DR3' de, 21-OHD ile negatif ilişkisi olan haplotiplerdir (3).

21-Hidroksilaz Eksikliğine yol açan mutasyonlar

CYP21A2 geninde **psödogen kaynaklı olan** ve **psödogen kaynaklı olmayan** mutasyonlar tanımlanmıştır. 15.03.2010 tarihine kadar Human Gene Mutation Database’ de kayıtlı 127 farklı mutasyon tanımlanmıştır (16).

Tablo 1. Human Gene Mutation Database (HGMD) 15.03.2010 tarihine kadar tanımlanmış CYP21A2 mutasyonlarının tipleri (16)

Mutasyon Tipi	Mutasyon Sayısı
Missense/nonsense	81
Splicing	8
Regülatör	1
Küçük delesyon	12
Küçük İnsersiyon	9
Küçük indel	3
Büyük delesyon	5
Büyük insersiyon	3
Kompleks Yeniyapılanma	5
Tekrar Varyasyonları	0
Toplam	127

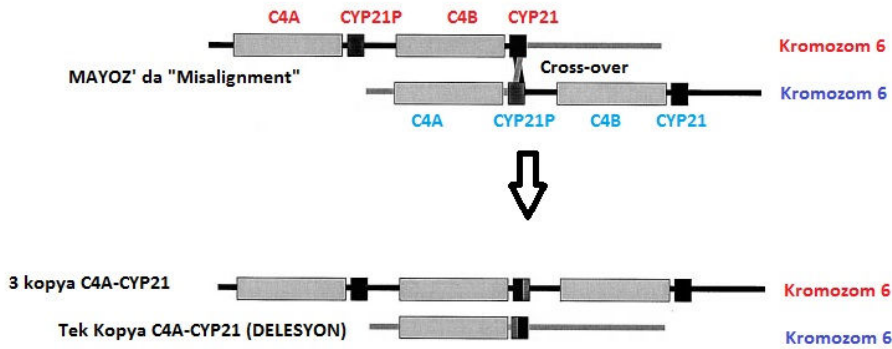
21-Hidroksilaz eksikliğinde görülen CYP21P (psödogen) kaynaklı mutasyonlar

21-Hidroksilaz eksikliğine yol açan mutasyonların çoğunluğu “Unequal Crossing-over“ (Şekil 7) ve “Gen Konversiyonu” gibi iki temel rekombinasyon sonucu CYP21P’ den (psödogen) aktarılaraq ortaya çıkmaktadır. CYP21P’ deki mutasyonlar Intron 2’ deki Adenin ya da Sitozin’ den Guanin’ e dönüşüm mutasyonu (**IVS2-13A/C→G**), ekzon 3’de bulunan 8 baz delesyonu (**G110Δ8nt**) ve 318. kodondaki nonsense mutasyonu (**Q318X**) içermektedir. Bunlar dışında CYP21P’ de saptanmış 7 missense mutasyon da 21-Hidroksilaz ekliği hastalarında görülmektedir (3).

- **Geniş Delesyonlar ve geniş konversiyonlar**

C4B ve CYP21 genlerini içeren **geniş delesyonlar** çoğu popülasyonlarda klasik 21-Hidroksilaz eksikliği hastalarının allellerinin **%20'sini** kapsamaktadır. Çoğu delesyonlu allel HLA-A3, HLA-Bw47 ve HLA-DR7 haplotipleriyle ilişkilidir (3, 19, 25). “Unequal Crossing-over“ rekombinasyonu sonucunda ortaya çıkan delesyonlar genellikle CYP21P' nin ekzon 3 ve ekzon 8' i arasında bir noktadan başlayıp, C4B' ye ve CYP21' e doğru 30 kb kadar uzanabilmektedir. Rekombinasyon sonucu 5' ucu CYP21P' ye 3' ucu CYP21' e ait olan bir CYP21 geni ortaya çıkmaktadır. CYP21P' nin taşıdığı delesyonlar aktivitenin olmadığı bir 21-Hidroksilaz' a yol açabilir. Homozigot delesyonlar her zaman *tuz kaybettiren tip* klinikle ilişkilidir. “Unequal Crossing-over“ rekombinasyonu sonucunda 30-kb' lık gen bölgesi içinde duplikasyonlara yol açarak 1 ya da 3 kopya kromozomal bölge ortaya çıkmasına neden olabilir (Şekil 7). CYP21 geninin içinde ya da 3' tarafında gelişen “crossing-over” lar 21-hidroksilaz aktivitesini etkileyebilir (3, 25, 34, 38).

Geniş konversiyonlar klasik 21-Hidroksilaz eksikliği hastalarının allellerinin **%10'unu** kapsar (3). Konversiyon sonucu psödogenden aktif gene aktarılan mutasyonlar enzim aktivitesini bozmaktadır.



Şekil 7. “Unequal Crossing Over” ile delesyon oluşumu (Speiser ve ark. dan değiştirilerek alınmıştır).

- **Nonsense ve Frameshift Mutasyonlar**

Geniş delesyonlar dışında enzim aktivitesinde tam kayba yol açan diğer mutasyonlardan ikisi: 318. kodondaki nonsense mutasyon olan **Q318X** ve ekzon 3’de bulunan **8 baz delesyonu**’ dur (3).

(Gln-318→term) Q318X

Mutasyon ekzon 8’ de 318. pozisyonda prematür terminasyona neden olan *Nonsense* bir mutasyondur. Mutant enzimin kalan aktivitesinin %0 olduğu gösterilmiştir. *Tuz kaybettiren tip* hastalıkla ilişkilidir (3, 11, 19, 31).

(G110Δ8nt) 8-baz Delesyonu

8-baz delesyonu ekzon 3’ de bulunmaktadır. *Frameshift*’ e neden olur. Mutant enzimin kalan aktivitesinin %0 olduğu gösterilmiştir. *Tuz kaybettiren tip* hastalıkla ilişkilidir (3, 11, 19, 31).

- **Intron 2’ deki A /C den G’ ye dönüşüm mutasyonu (IVS2-13A/C→G) nt656g**

Intron 2’de sondan 13 baz önceki nükleotid normalde Adenin ya da Sitozin’ dir. Bu Adenin ya da Sitozin’ in Guanin’ e dönüşümü (nt656g) klasik 21-Hidroksilaz eksikliğine bağlı KAH’ de *en sık* görülen alleldir. Mutasyon, intron 2’ nin yanlış splice’ sina, 19 nükleotidin mRNA’ dışında kalmasına ve okuma çerçevesinin kaymasına neden olur (*Anormal splicing*). Çok az normal enzim aktivitesi saptanabilir (<%5) fakat bu mutasyon için homozigot ya da hemizigot olan hastaların tuz kaybettirici tip hastalıkla ilişkili oldukları bilinmektedir. Sıklıkla bu mutasyonu taşıyan hastaların *tuz kaybı bulguları* ilerleyen aylarda çıkmaktadır (3, 11, 19, 31).

- **Ile-Val- Met-236-239→Asn-Glu-Lys (I236N/V237E/M239K)**

E6 Cluster Mutasyonları

Ekzon 6’ da bu 3 mutasyonun toplandığı bölgedeki G heliksinin etkilenmesi, enzim aktivitesinde tamamen kayba yol açmaktadır. Enzimin

hedefine bağlanmasını bozduğu gösterilmiştir. *Tuz kaybettiren tip* ile ilişkilidir (3, 31, 38).

- **(Arg356→ Trp) R356W**

Ekzon 8’ deki bu mutasyon enzim aktivitesi tamamen yok etmektedir. *Tuz kaybettiren tip* ile ilişkilidir (3, 31).

- **(Pro-30 →Leu) P30L**

Ekzon 1’ de saptanmaktadır. Kültüre edilmiş hücrelerde %30-60 oranında normal aktiviteye neden olan bir mutasyon olsa da enzimin anstabil olabileceğine dair kanıtlar gösterilmiştir. Diğer P50 enzimleri gibi CYP21’ de enzimatik aktivitesi ve stabilitesi için amino terminus bölgesinde diğer polipeptid alanından prolin’ler ile ayrılmış hidrofobik bir “tail” taşımaktadır. P30L mutasyonunun bu prolin’ leri etkileyerek enzim aktivitesi ve *stabilitesinde kayba* yol açtığı tartışılmıştır. P30L Non-klasik 21-Hidroksilaz eksikliği hastalarının yaklaşık %15’ inde bulunmaktadır (3, 11, 19, 38).

- **(Ile-172→Asn) I172N**

Ekzon 4’de bulunan Frameshift bir mutasyondur. Normalin %1’ i civarı enzim aktivitesine yol açan bu mutasyon özellikle basit virilizan tip hastalıkla ilişkilendirilmiştir. İzolösün bölgelerinin I172N mutasyonu sonucu etkilenmesi enzimin *endoplazmik retikulum ile ilişkisini zayıflatarak*, enzimin uygun olmayan bir şekilde yerleşmesine neden olabileceği tartışılmıştır. Enzimin kalan %1’ lik aktivitesinin aldosteron sentezi için yeterli olabildiği ve tuz kaybına neden olmadığı gösterilmiştir (3, 11, 19, 31, 38).

- (Val-281→Leu) V281L

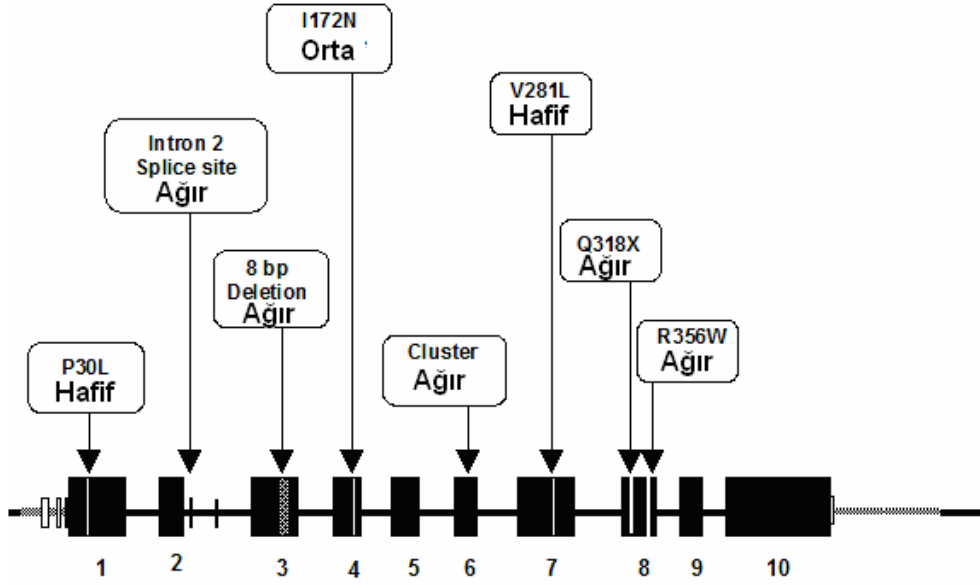
Ekzon 7'deki bu mutasyon *endoplazmik retikulum ile ilişkisini zayıflatarak* kalan enzim aktivitesinin %20-50 oranına düşmesine neden olmaktadır. HLA-B14;DR1 haplotipini taşıyan neredeyse tüm Non-klasik hastalarda V281L mutasyonu görülmektedir. Yaklaşık %70 Non-klasik allel bu mutasyonu taşımaktadır (3, 11, 19, 31, 38).

21-Hidroksilaz ekliğinde görülen CYP21P (psödogen) kaynaklı olmayan mutasyonlar

21-Hidroksilaz eksikliğine yol açan mutasyonların çoğu CYP21P' de bulunsa ve CYP21' e buradan aktarılsa da %5-10 oranındaki mutasyonlar bu şekilde ortaya çıkmamaktadır. Otomatize dizi analizi çalışmalarının yaygınlaşması bu nadir görülen mutasyonların tanımlanmasını sağlamıştır (3). Psödogen kaynaklı olmayan mutant alleller genellikle intergenik rekombinasyonlar sonucu ortaya çıksada, de novo delesyon ve gen konversiyonları sonucunda da ortaya çıkabilmektedir.

Tablo 2. CYP21' de sık saptanan mutasyonlar, fonksiyonel etkileri ve klinik ilişkileri (3) .

Değişikliğin Adı	Mutasyon	Etki	Enzim Akt.
Delesyon ve konversiyonlar	-	Enzim yok	%0
G110Δ8nt	Δ708-715	Frameshift	%0
E6 cluster mutasyonları: I236N V237E M239K	1382 T→A 1382 T→A 1382 T→A	Bozuk sübstrat bağlama	%0
Q318X	1996 C→T	Nonsense	%0
R356W	2110 C→T	Bozuk Redüktaz ilişkisi	%0
IVS2-13A/C→G	656 A/C→G	Anormal splice	<%5
I172N	1001 T→A	Bozuk ER' ye giriş	%1
V281L	1685 G→T	Bozuk ER' ye giriş	%20-50
P30L	89 C→T	Bozuk ER' de yerleşim	%30-60



Şekil 8. Sık görülen 8 mutasyon, gen içindeki pozisyonları ve fenotipik etkileri.

2.6 Konjenital Adrenal Hiperplazi’ de Genotip Fenotip İlişkisi

Klinik sınıflandırmada, 21-Hidroksilaz eksikliği hastalarının Aldosteron sentez edemeyenleri tuz kaybettiren grupta yer alırken, tuz kaybettirmeyen fakat prenatal virilizasyon bulguları gösterenleri basit virilizan grubunda yer alırlar. Etkilenmiş dişilerin virilize olmadığı daha hafif form Non-klasik tiptir. Bu sınıflandırma genotip-fenotip uyumluluğunu ortaya koymada da kullanılmaktadır. Delesyonlar ve geniş konversiyonlar genellikle tuz kaybettiren tip hastalıkta saptanırken, nt656g (IVS2) mutasyonu hem tuz kaybettiren hem basit virilizan formlarda saptanmaktadır. I172N karakteristik olarak basit virilizan tip hastalarda saptanır. P30L ve V281L mutasyonları nonklasik 21-Hidroksilaz eksikliği ile daha çok ilişkilidir (**Şekil 9**). Bu dağılım hastaların geri kalan enzim aktivitesi ile de uyumludur (3, 31, 39). Farklı mutasyonlar için birleşik heterozigot olan hastalarda bu yaklaşımın öngörücülüğü azalmaktadır.

Tablo 3. CYP21’ de sık saptanan mutasyonlar ve klinik ilişkileri.

Mutasyon	Tip	Klinik ilişkisi
Delesyon ve konversiyonlar	<i>Ağır (Tip-A)</i>	Tuz kaybettiren
G110Δ8nt	<i>Ağır (Tip-A)</i>	Tuz kaybettiren
E6 cluster mutasyonları: I236N, V237E, M239K	<i>Ağır (Tip-A)</i>	Tuz kaybettiren
Q318X	<i>Ağır (Tip-A)</i>	Tuz kaybettiren
R356W	<i>Ağır (Tip-A)</i>	Tuz kaybettiren
IVS2-13A/C→G	<i>Orta (Tip-B)</i>	Basit virilizan
I172N	<i>Orta (Tip-B)</i>	Basit virilizan
V281L	<i>Hafif (Tip-C)</i>	Non klasik
P30L	<i>Hafif (Tip-C)</i>	Non klasik

Mutasyonların enzim aktivitesinin etkilenmesi derecesine göre :

-ağır ya da Tip-A (enzim aktivitesinin tamamen kaybolduğu genotipler: Geniş delesyonlar, geniş konversiyonlar, 8 baz delesyonu, E6 cluster mutasyonları, Q318X ve R356W

-orta ya da Tip-B (IVS2 ve enzim aktivitesinin %1 civarı kaldığı genotip I172N)

-hafif ya da Tip-C (%20-60 enzim aktivitesinin kaldığı genotipler V281L ve P30L) şeklinde sınıflandırıldığında (Tablo 3):

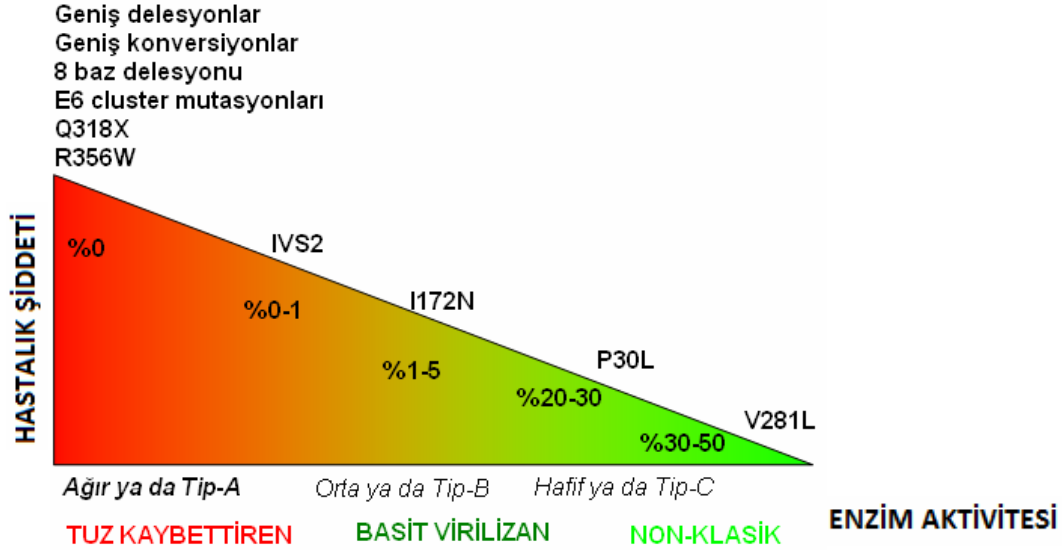
Tuz kaybettiren tip; ağır/ağır genotip

Basit virilizan tip; ağır/orta ya da orta/orta genotip

Non-klasik tip; ağır/hafif, orta/hafif ve hafif/hafif genotipler ile ilişkilendirilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda bu ilişki yaklaşık %80 oranında doğru öngörüm getirmektedir (3).

Genotip-fenotip uyumluluğu yüksek olan bu hastalıkta da bazı uyumsuzluklar rapor edilmiştir (3, 40). Raporlanan uyumsuzluklar özellikle nt656g, I172N mutasyonlarını ve birbirinden çok farklı enzimatik aktiviteye sahip mutasyonların birleşik heterozigot oldukları durumları içermektedir. Nt656g mutasyonu ağır klinikle ilişkilendirilse de bazı vakalarda yeterli enzimatik aktiviteye izin vermektedir. Yine I172N mutasyonu %1 civarındaki enzimatik aktivitesiyle basit virilizan tiple ilişkilendirilirken bazı vakalarda tuz kaybını engelleyemediği raporlanmıştır (40).

Fenotipi, kalan 21-Hidroksilaz aktivitesi dışında etkileyen başka genetik ya da çevresel faktörlerin varlığı tartışılmaktadır. Aynı mutasyona sahip kardeşlerin farklı şiddette tuz kaybı yaşamaları ya da enzim aktivitesi olmayan hastaların tuz kaybı şiddetinin zamanla azalabilmesi bunlara en iyi örneklerdir (3).



Şekil 9. Sık görülen mutasyonlar, enzim aktivitesine etkileri ve fenotipik sonuçları.

2.7 Konjenital Adrenal Hiperplazi' de Prenatal Tanı ve Tedavi Yaklaşımları

Konjenital Adrenal Hiperplazi prenatal tanısı mümkün olan hastalıklardandır. Prenatal tanı endikasyonu ve talebi olan aileler öncelikle genetik danışma ile prenatal tanının amacı, süreci ve muhtemel sonuçları hakkında bilgilendirilmelidirler. Genetik danışmada prenatal tanının temel amaçları ailenin etkilenmiş bir çocuğa sahip olmasını engellemek, ailenin doğacak çocukla ilgili endişelerini azaltmak ya da genetik hastalıklı doğacak bir çocuğa hazırlamak olmalıdır. Genetik danışmada, prenatal tanıyı tamamlayıcı prenatal tedavi yaklaşımlarıyla etkilenmiş dişi fetüsün virilizasyonunun azaltılabileceği açıklanmalıdır (3,11,41).

2.7.1 Prenatal Tanı Yaklaşımları

Prenatal tanıda CYP21 mutasyon analizlerini CYP21 dışı moleküler genetik incelemeleri ve biyokimyasal testleri içeren birçok yöntem kullanılabilmektedir.

Ailede etkilenmiş bireyin olduğu durumda, etkilenmiş bireyin CYP21 genotipinin bilinip bilinmemesi prenatal tanı planını yönlendirmede ilk etkindir.

CYP21 mutasyonunun bilindiği ailelerde 21-Hidroksilaz eksikliğine bağlı konjenital adrenal hiperplazinin prenatal tanısı gebeliğin ilk trimesterinde CVS ya da amniosentez sonucu elde edilen fetal DNA' nın kullanılmasıyla direkt moleküler genetik analiz ile yapılabilmektedir.

Etkilenmiş bireyin CYP21 genotipinin bilinmediği durumlarda CYP21 lokusuyla olan sıkı bağlantısı nedeniyle HLA haplotiplemesi tanıda kullanılabilen yöntemlerdendir. Prenatal tanıda ancak etkilenmiş birey varlığında kullanımı mümkün olan HLA haplotiplemesi, gerçekleştirilebilmesi durumunda yüksek güvenilirliğe sahiptir (3, 37).

Ailede etkilenmiş bireyin ve spesifik genetik tanının mümkün olmadığı durumlarda biyokimyasal yaklaşımlarla 17-OHP seviyelerinin amniotik sıvıda ölçülmesi uzun zamandır kullanılabilen bir yöntem olsa da, 17-OHP' un amniotik sıvıda artmadığı Non-klasik ve basit virilizan formlar ile deksametazon tedavisi alan annelerde kullanılamaması gibi dezavantajları nedenleriyle çok tercih edilmemektedir. Benzer şekilde diğer spesifik yaklaşımların gerçekleştirilemediği durumlarda fetal cinsiyetin belirlenmesi prenatal tanı için yönlendirici olabilmektedir. Prenatal sitogenetik yöntemlerle fetal cinsiyetin XX saptandığı durumlarda ultrasonografi ile fetüsün dış genital yapılarında virilizasyon bulguları tanımlanması fetüsün etkilenmiş olduğunu işaret edebilmektedir.

2.7.2 Prenatal Tedavi Yaklaşımları

Konjenital adrenal hiperplazide dışı fetüste dış genitalyanın virilizasyonu postnatal dönemde cerrahi yaklaşımlarla büyük oranda düzeltilebilmektedir. Bu durum virilizasyonun ağırlığı temelinde probleminin etkili bir çözümü gibi görünse de hasta ve aileye fiziki ve ruhsal yükler getirmektedir. Prenatal dönemde plasentayı geçebilen, güçlü bir yarı sentetik steroid olan "Dexamethasone" un anneye uygulanması, fetal

adrenaldeki aşırı androjenik aktiviteyi baskılayabilmekte ve hastaların %60'ında prenatal virilizasyonu engellemekte ya da azaltmaktadır (3, 13, 37).

Özgün prenatal tedavi protokolleri, prenatal tanı yöntemlerinin kullanımının artışı ile paralel biçimde gelişmektedir. Prenatal tedavi yaklaşımları detaylı bir genetik danışmayla başlamaktadır. Genetik danışmada vurgulanması gereken esaslar verilen tedavinin muhtemel maternal yan etkilerini, fetüs üzerindeki muhtemel fakat şuanda bilinmeyen yan etkilerini ve tedavinin değişken etkinliğini içermektedir. Annenin tedaviden etkilenebilecek bilinen bir rahatsızlığının olup olmadığı sorgulanmaktadır. Gestasyonel diabet, overt diabet ya da hipertansiyon gibi durumlar verilecek tedaviden etkilenebilmektedir.

Tedavinin 8-9. gestasyonel haftadan önce başlaması önerilmektedir (3, 13, 18). Tedavide Dexamethasone toplamda 20µg/kg/gün olacak şekilde 3 eşit doza ayrılarak verilmelidir. 10.hafta civarı CVS gerçekleştirilmeli fetal cinsiyet ve fetüsün KAH' dan etkilenip etkilenmediği CYP21 genotiplemesi ya da HLA haplotiplemesiyle saptanmalıdır.

Erkek ya da etkilenmemiş dişi olduğu saptanan gebelerin tedavisi kesilmelidir.

Fetüs dişiye ya da KAH prenatal tanısı mümkün değilse tedavi devam etmelidir.

Benzer şekilde 14-15. haftalarda amniosentez ile de fetal cinsiyet ve KAH prenatal tanısı gerçekleştirilip tedavi planlaması yapılabilmektedir (3, 13, 18).

Tedavi alan anneler hiperglisemi, hipertansiyon, aşırı kilo alımı ve psikiatrik problemlere karşı takip edilmelidir. Tedavinin güvenilirliği tam olarak ortaya konulmamış olsa da düşük dozda dexametasone ile tedavi edilmiş fetüslerin bu durumdan olumsuz etkilenmedikleri düşünülmektedir. Fakat yine de fetal takipte büyüme geriliği, hidrosefali, hidrometrokolpos gibi problemlere dikkat edilmesi önerilmektedir (18).Yapılan çalışmalar ve 10 yılı bulan uzun dönem takipleri sonucunda herhangi bir yan etki raporlanmamıştır (15). Kısa önemde ise perinatal takipte fetal adrenal supresyon olasılığı mutlaka akılda tutulmalıdır (Şekil 10).

değişikliklerinin saptanabildiği kromozom analizleriyle bu değişikliklerin hastalıklarla ilişkileri ortaya konulabilmektedir.

Bu çerçevede kromozom analizi gerçekleştirilmesi gereken bazı durumlar şunlardır:

1. Büyüme ve gelişme sorunları (Mental retardasyon, büyüme ve gelişme geriliği, dismorfizm, multiple konjenital malformasyonlar, kuşkulu genital yapı)
2. Ailesel kromozomal anomali öyküsü
3. Fertilite problemleri (İnfertilite ya da tekrarlayan düşük öyküsü olan çiftler, amenore ile başvuran kadınlar)
4. Neoplaziler
5. İleri yaş gebelikleri (Prenatal sitogenetik yaklaşımlar)
6. Gebelikte USG anomalileri
7. Ölü doğum ve neonatal ölüm.
8. Rekürren spontan abortuslarda, düşük materyalinin sitogenetik analizi

Yukarıda bahsedilen amaçlarla kromozom analizi gerçekleştirmek için en sık periferik kandaki beyaz küreler kullanılmaktadır. Hastadan alınan kan örneğinden hücre kültürü oluşturulur, beyaz kürelerin bölünmesi uyarılır. Belli süreler sonunda bölünmeleri hücre döngüsünün metafaz fazında durdurulur ve metafaz kromozomları elde edilir. Analize uygun yöntemlerle boyanmak üzere lamplara yayılır. Rutin sitogenetik analizde en sık kullanılan yöntem olan G-Bantlama’ da preparatlar Giemsa boyasıyla boyanır ve ışık mikroskopunda incelenir. Kromozomların ayırt edilmesinde ve bantların tanımlanmasında uluslararası kabul görmüş “International System For Human Cytogenetic Nomenclature” (ISCN) sınıflandırma sistemi kullanılır (41).

- **FISH**

Bir kromozomun tamamının ya da bir kromozom bölgesinin sayısını ve organizasyonunu değerlendirmek için ve özel bir DNA dizisinin varlığını ya da yokluğunu gösterebilmek için Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde ilgilenilen kromozoma, kromozom bölgesine ya da

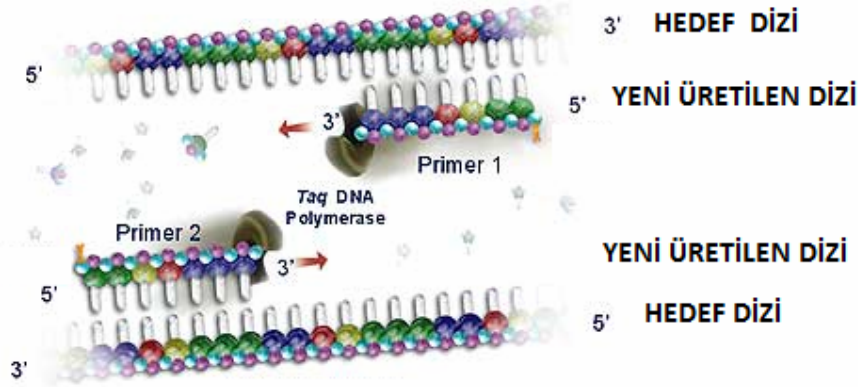
DNA dizinine özgü probler kullanılır. Problar sitogenetik yöntemlerle hazırlanmış preperatlara uygulanır ve hem metafaz kromozomları hem de interfaz hücreleri üzerinde etkindirler. Probların özgün olarak hazırlandıkları DNA dizinlerini floresan boya ile işaretlemesi ve preperatın uygun floresan mikroskopta incelenmesiyle, o dizinin varlığı ya da yokluğu ve metafazda kromozomlar üzerindeki lokalizasyonu belirlenebilir. Bu moleküler sitogenetik yöntem rutin sitogenetik analizin hem kapsamını hem de kesinliğini belirgin şekilde genişletmiştir. Ayrıca hızlı sonuç alma ve interfaz nükleuslarında kullanım imkanı sağlamasından dolayı prenatal tanıda sıklıkla kullanılmaktadır (41).

KAH gibi kuşkulu genital yapıya neden olan hastalıklarda genotipik cinsiyetin hızla belirlenmesi kritik bir öneme sahip olduğundan X ve Y kromozomlarına yönelik FISH analizleri sıklıkla kullanılmaktadır.

- **PCR ve Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR ve RFLP)**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu iki oligonükleotid primer arasındaki bir DNA fragmanın enzimatik çoğaltılmasıdır. Bu primerler ilgilenilen DNA dizisini, her iki zincirde birbirine zıt yönde sınırlayacak şekilde hedef DNA dizisine komplementer olarak dizaynedilmiştir. Primerler arasında kalan dizin DNA polimeraz enzimiyle sentez edilerek kopyalanmış olur.

Reaksiyon “Denatürasyon”, “Annealing” ve “Elongasyon”dan oluşan 3 adımda tamamlanır. “Denatürasyon” adımı 95°-100°’de gerçekleşir ve hedef DNA ikili zincirinin Hidrojen bağları kopar iki tekli zincir haline gelir. Primerlerin tekli zincir hedef DNA’ ya ideal hibridize olduğu ısı “Annealing” ısıdır ve primerlerin nükleotid dizilimine göre değişkenlik gösterir (40°-60°). 3. adım olan “Elongasyon” da DNA polimeraz enzimi aktive olur ve ortamdaki Deoksi-Adenozin (dATP), Deoksi-Timidin (dTTP), Deoksi-Guanozin(dGTP) ve Deoksi-Sitidin (dCTP) Trifosfat moleküllerini kullanarak hedef DNA’ ya komplementer zincirin sentezini gerçekleştirir. Bu adımda 70°-75°’ de gerçekleşir. Bu üç adımın her tamamlanışı (bir siklus) hedef DNA dizisinin miktarının iki kat artışıyla sonuçlanır. Bir PCR reaksiyonu ortalama 20-40 siklustan oluşur (Şekil 11).



Şekil 11. PCR reaksiyonu.

Restriksiyon enzimleri (Restriksiyon Endonükleazları) DNA dizininde kendilerine özgül nükleotid dizilerini tanıyıp ikili ya da tekli zincir DNA' yı kesen enzimlerdir. DNA dizilerindeki değişiklikler (mutasyonlar ya da polimorfizmler) restriksiyon enzimlerinin belirli kesim bölgelerini bozabilir ya da yeni kesim bölgesi yaratabilirler. Bunun sonucunda da DNA dizisindeki değişikliğin farklı kesim ürünleri ortaya çıkacaktır. RFLP yöntemi ile tek nükleotid polimorfizmleri gösterilebileceği gibi bilinen mutasyonlar da tanımlanabilir. Mutasyonların oluşturdukları ya da yok ettikleri “restriksiyon enzimi tanıma bölgeleri” nin oluşturdukları özgün kesim ürünlerinin etidium bromide ile boyanmış agaroz jelde yürütülmesiyle tanınması mümkündür (41).

Bu yöntem 21-Hidroksilaz eksikliğine bağlı Konjenital Adrenal Hiperplazi' nin de dahil olduğu mutasyonu bilinen bir çok genetik hastalıkta kullanıldığı gibi, preimplantasyon genetik tanıda da mutasyonların taranması için kullanılmaktadır.

- **Allele Özgü Oligonükleotid Hibridizasyonu – Klonlanmış DNA Problemleri ile Southern Blot Analizi**

Bir genetik hastalığa ait tanımlanmış mutasyonların taranmasında kullanılan etkili bir yöntemdir. Allele-specific Oligonucleotide (ASO) mutant ya da normal DNA dizinine komplementer hazırlanmış bir probdur. Bu sentetik oligonükleotidler hedef DNA ile aralarında tek baz uyumsuzluk olduğu durumda

bile hibridize olmazlar. Böylece hedef DNA' daki tek baz dizi değişikliklerini bile yansıtabilirler.

21-Hidroksilaz eksikliğine bağlı Konjenital Adrenal Hiperplazi' de bilinen nokta mutasyonları Allele Özgü Oligonükleotid (*Allele-specific oligonucleotide-ASO*) problemleri kullanılarak tanınabilmektedir.

Ayrıca CYP21 cDNA klonu elde edilmesiyle delesyonların ve konversiyonların etkiledikleri gene-özü kesim (restriction) noktaları ***Southern Blot*** ile tanınır hale getirilebilmektedir. Bu da çoğu popülasyondaki allellerin %25' ini kapsamaktadır (3, 41).

- **Single strand conformation polymorphism (SSCP)**

Tekli zincir DNA molekülünün nükleotid dizisindeki değişikliklerin oluşturduğu biçim (konformasyon) farklılıklarının kullanıldığı bir yöntemdir. SSCP analizi, örneklerin nondenatüran poliakrilamid jel elektroforeziyle yürütülmesi ve nükleotid dizilimleri dolayısı ile konformasyonları farklı olanların, farklı hareketlerinin gözlenmesiyle yapılır. Bu yöntemle allele özgü çalışmalarda tanımlanamayacak yeni mutasyonlar saptanabilir (43).

- **Ligation detection reaction (LDR)**

DNA ligaz bir oligonükleotidin hedef DNA' ya hibridize olduğunda fosfodiester bağları oluşturan bir enzimdir. Bağların oluşması ve oligonükleotidin DNA' kenetlenmesi (seal) bu ikisinin uyumu ile paraleldir. Tek bazlık uyumsuzluk reaksiyonu engeller. Bu sayede nokta mutasyonları özgün oligonükleotidler kullanılarak saptanabilir (43).

- **Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)**

2002 yılında tanımlanmış olan yöntem ile aynı anda 50 genomik DNA dizisinin anormal kopya sayısı multipleks PCR reaksiyonu temelinde saptanabilmektedir. Denetlenen genomik DNA dizilerinin bir baz farklılıkları dahi saptanabilmektedir. Reaksiyonda alışımlı hedef DNA amplifikasyonunun aksine MLPA problemleri amplifiye edilir. Reaksiyonun ilk aşamasında denatüre edilmiş DNA' ya problemler hibridize edilir. Denetlenecek her bir DNA dizisi için 2

yarı-prob mevcuttur. Her bir yarı-prob hedef DNA' ya komplementer olan (Hibridizasyon dizisi) bir kısım ve PCR Primer kısmı içerir (**Şekil 12-1**). Denatürasyon ve hibridizasyon sonrası 2 yarı-prob hedef DNA' ya tutunmuştur. Eğer Hibridizasyon dizisi hedef DNA' ya tam hibridize olmuşsa (Hedef DNA dizisinde bir değişiklik yoksa) Ligasyon reaksiyonu 2 yarı probu birbirine bağlar, tek bir prob oluşur (**Şekil 12-2**). Bu problemler özgün uzunluktadır. Ligasyon sonucu ortaya çıkan prob iki PCR primerine sahip olduğundan sonraki adımdaki PCR işleminde bu prob amplifiye edilir (**Şekil 13-3**). Hedef DNA' ya tam hibridize olamayan yarı-problemler ligasyonla birleştirilmez ve PCR işleminde iki primeri olmadığından amplifiye edilmez. Kapiller elektroforezde yürütüldüğünde amplifiye olmuş olan problemler uzunluklarına özgün piklerle kendilerini gösterir (**Şekil 23**). Piklerden elde edilen "Relatif Peak Area" lar referans kontrollerle karşılaştırılıp, problemlerin hibridize oldukları DNA dizileri hakkında kopya sayısı açısından bilgi elde edilir.

1. DENATÜRASYON ve HİBRİDİZASYON



2. LİGASYON



3. PCR

Yalnızca ligasyonla birleşmiş problemler amplifiye olur.



Her prob özgün uzunluğundadır.
Kapiller elektroforezde uzunluğuna özgün pikini gösterir.



Şekil 12. MLPA reaksiyonun basamakları (www.mlpa.com' dan değiştirilerek alınmıştır)

- **DNA Dizi Analizi**

DNA dizi analizi ilgilenilen DNA bölgesinin nükleotid dizilimi ortaya koyduğundan, yeni mutasyonların tanımlanma şansı doğmaktadır. DNA dizi analizi diğer yöntemlerin mutasyonu tanımlayamadığı durumlarda ve popülasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

DNA dizi analizinde günümüzde kullanılan en yaygın yaklaşım 1980 yılında geliştirilen Sanger yöntemidir. Yöntemin temelinde orijinal kalıp dizi için komplementer DNA dizisini sentezleyen DNA polimerazın terminator nükleotidlerle reaksiyonun durdurulması yatmaktadır. Normade DNA, dört çeşit deoksiniükleotid trifosfatla sentezlenir. Her bir nükleotid 3' -OH ucundan bir sonraki nükleotide bağlanır. Sanger yöntemiyle sentetik oligonükleotid sentezinde 3' -OH molekülü kritik rol oynar. Sentez sırasında zincire bir dideoksiniükleotid eklenmesi zincir uzamasını sonlandırır. Çünkü 3. karbon atomundaki 3'-OH molekülünün oksijen atomu bulundurmaması zincirin uzamasına izin vermez. Reaksiyonda asimetrik amplifikasyon ile elde edilmiş tek iplikçikli DNA; DNA Polimeraz enzimi ile ddNTP ve bir tanesi radyoaktif olarak isaretlenmiş dNTP kullanılır. Ortama radyoaktif P32, S35 veya P33 eklenir. Isaretleme primerlere ya da ortama eklenen dNTP'lerden birisine de yapılabilir. DNA zincirinin uzamasının durduğu bu reaksiyon sonucunda, primer sonundan başlayıp; prematüre sonlanmaların olduğu bölgeler kadar uzunluktaki DNA parçaları ortaya çıkar. Dört farklı enzimatik reaksiyonda, dört farklı ddNTP kullanılarak (A,C,G,T) birer reaksiyon elde edilir. Yüksek hassasiyetli poliakrilamid jel elektroforezi ya da kapiller elektroforezde yürütülen örnekler, ilgilenilen DNA bölgesinin dizisini ortaya koyar.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1 Materyal

Hasta Grubu

Bu çalışmaya yaş aralığı gözetmeksizin 2005-2010 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ile Pediatri Anabilim Dalı Genetik ve Endokrinoloji Bilim Dalları tarafından takip edilen 21-Hidroksilaz Eksikliğine bağlı Klasik Tip Konjenital Adrenal Hiperplazi tanılı sitogenetik ve CYP21 ilişkili moleküler genetik çalışmaları tamamlanmış 26 hasta dahil edilmiştir. Hastalarla ilgili bilgilere Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Pediatrik Genetik Bilim Dalı hasta dosyalarından ulaşılmıştır. Tüm çalışmalar hasta ailelerinden onam alınarak yürütülmüştür.

3.2 Metod

Hasta popülasyonunda, literatürde farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalarda sık rastlanan 7 nokta mutasyonu ve 2 delesyona yönelik RFLP ve MLPA uygulamaları yürütülmüştür.

3.2.1 Moleküler Tanı Testleri

Hastalardan alınan periferik kan örneklerinden High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) kullanılarak DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Kan örneklerinin 200 µl' si ependorf tüpüne aktarıldı. Tüpe 200 µl Binding Buffer eklendi ve pipetaj yapıldı. Ardından 40 µl Proteinaz K eklendi ve pipetaj yapıldı. Tüp vorteksendi ve 70°C' de 10 dakika bekletildi. Süre sonunda tüpe 100 µl izopropanol eklendi, pipetaj yapıldı ve tüm solüsyon filtreli tüpe aktarıldı. 8000 Rcf' de 1 dakika santrifüj edildi. Filtreli tüpün altındaki ependorf atıldı, filtreli tüp yeni ependorfa yerleştirildi. Filtreli tüpe 500 µl Inhibitor Removal Buffer eklendi ve 8000 Rcf' de 1 dakika santrifüj edildi. Alt tüp atıldı yenisi yerleştirildi. Filtreli tüpe 500 µl Washing Buffer eklendi ve 8000 Rcf' de 1 dakika santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atıldı ve aynı

işlem tekrarlandı, alt tüp atıldı, yenisi yerleştirildi. 13000 Rcf’ de 10 saniye santrifüj edildi. Alt tüp atıldı. Filtreli tüp DNA’ nın saklanacağı ependorfa yerleştirildi. 70°C’ de ısıtılmış olan Elution Buffer’ dan 50 µl eklendi 10 saniye beklendi. 8000 Rcf’ de 1 dakika santrifüj edildi. DNA’ nın içinde toplandığı Ependorf tüpü hasta bilgileriyle etiketlenerek -20°C’ ye kaldırıldı.

3.2.2 Cyp21 Geninde İncelenen Bölge ve Kullanılan Primerler

Literatürde farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalarda rastlanan 7 nokta mutasyonu, 8-bp’ lik delesyon ve daha geniş delesyonlar PCR amplifikasyonunu takiben RFLP yöntemiyle incelendi. Bu 9 değişikliğin incelenmesi için özgün primerlerle 6 farklı pcr amplifikasyonun gerçekleştirildi (Tablo 4) (Şekil 13).

7 nokta mutasyonu için CYP21 genine özgün 4 farklı PCR amplifikasyonu için psödogeni amplifiye etmeyen özgün primerler kullanıldı (Tablo 4). Elde edilen PCR ürünleri uygun Restriksiyon Enzimleriyle kesildi (Tablo 8-9). PCR-RFLP yöntemiyle taranan **P30L**, **IVS2-13A/C**, **I172N**, **E6 Cluster (I236N/V237E/M239K)**, **V281L**, **Q318X** ve **R356W** mutasyonlarının allellerine özgün DNA fragmanları (Tablo 9) agaroz jelde gösterildi.

8-bp delesyonu ya da **geniş delesyon**ların saptanabilmesi için 2 farklı PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Birinci amplifikasyonda CYP21 ve CYP21P genlerinin 3. ekzonundaki bölgeyi özgün olmayan bir şekilde amplifiye eden P7 ve P8 primerleri kullanıldı ve delesyon gösterildi. 8-bp delesyonu ve geniş delesyon ayırımı yapabilmek için CYP21 genine özgün ikinci bir pcr amplifikasyonu gerçekleştirildi.

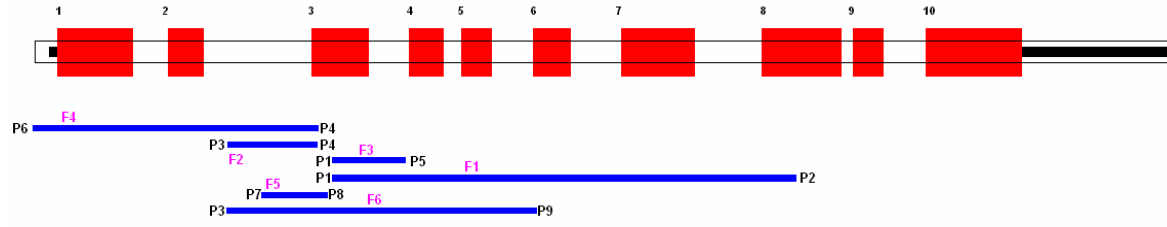
Tablo 4. CYP21 geni PCR amplifikasyonunda kullanılan primerlerin dizileri.

(Listede reverse primerler koyu ve italik yazı tipiyle belirtilmiştir. Altı çizilen bazlar ilgili primerin CYP21 genine özgün olmasını sağlamaktaydı.)

<u>Primer</u>	<u>Sekans (5'-3')</u>
P1	GGACCTGTCCTTGGG <u>GAGACTAC</u>
<i>P2</i>	GCCGTGTGGTGCGGTGGGGCAAGGCTA
P3	AGGTCAGGCCCTC <u>A</u> GCTGCCTT <u>CA</u>
<i>P4</i>	GGCTTTCCAGAGCAGGGAGTAGTC
<i>P5</i>	TCTCCGAAGGTGAG <u>GTACCAG</u>
P6	TCGGTGGGAGGGT <u>TACCTGAA</u>
P7	GTCTAGGAACTACCCGGACCTGTC
<i>P8</i>	CTTCTTGTGGGCTTTCCAGAGCAG
<i>P9</i>	AGCTGC <u>A</u> TCTCC <u>ACG</u> <u>ATGTGA</u>

Tablo 5. PCR çalışmasında kullanılan primerler ve elde edilen PCR fragmanlarının büyüklükleri.

FRAGMAN	FORWARD PRİMER	REVERSE PRİMER	PCR ÜRÜNÜ
Fragman I	P1 (Ekzon 3)	P2 (Ekzon 8)	1460 bp
Fragman II	P3 (İntron 2)	P4 (Ekzon 3)	128 bp
Fragman III	P1 (Ekzon 3)	P5 (Ekzon 4)	330 bp
Fragman IV	P6 (Promoter)	P4 (Ekzon 3)	854 bp
Fragman V	P7 (Ekzon 3)	P8 (Ekzon 3)	56-64 bp
Fragman VI	P3 (İntron 2)	P9 (Ekzon 6)	789 bp



Şekil 13. PCR’ da elde edilen fragmanların gendeki ekzonlarla ilişkisi.

3.2.5 PCR ürünlerinin elde edilmesi

Her bir hasta için 6 farklı PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Fragman 1 için 50µl total hacimde, diğer fragmanlar için 25µl total hacimlerde PCR amplifikasyonları gerçekleştirildi (Tablo 6 ve 7).

Tablo 6. PCR çalışmasında kullanılan bileşenlerin miktarları.

REAGENT	STOK SOLUS.	WORKING SOLUS.	50 ya da 25 µl REAKSIYON HACMI İÇİN GEREKLİ MİKTAR					
			F1	F2	F3	F4	F5	F6
10X <i>Taq</i> buffer	10X	10x	5µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl
dNTP mix	20mM	2mM	6µl	3µl	3µl	3µl	3µl	3µl
Primer I	1600ng/µl	160ng/µl	0,8µl	0,4µl	0,4µl	0,4µl	0,4µl	0,4µl
Primer II	1600ng/µl	1600ng/µl	0,8µl	0,4µl	0,4µl	0,4µl	0,4µl	0,4µl
<i>Taq</i> Polymerase	5u/µl	5u/µl	0,4µl	0,2µl	0,2µl	0,2µl	0,2µl	0,2µl
MgCl ₂	25mM	25mM	- (10X <i>Taq</i> buffer içinde mevcuttu)					
DISTİLE SU			35µl	17,5µl	17,5µl	17,5µl	17,5µl	17,5µl
TEMPLATE DNA			2 µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl
REAKSIYON HACMI			50 µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl

PCR amplifikasyonunda kullanılan primerler, liyofilize halden 1600ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde sulandırılıp stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyondan 160ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde working solüsyon hazırlandı. Stok dNTP

solüsyonu her biri 100mM konsantrasyondaki ATP, CTP, GTP ve TTP stok solüsyonlarından eşit miktarlarda alınıp bir birim distile su eklenerek 20mM konsantrasyonda hazırlandı. Stok dNTP solüsyonun sulandırılarak 2 mM'lık working solüsyon elde edildi (Tablo 6).

Tablo 7. PCR çalışmasında kullanılan Thermal Cycler programları

PCR Programları	ISI						SÜRE	SİKLUS
	F1	F2	F3	F4	F5	F6		
Denatürasyon :	95°	95°	95°	95°	95°	95°	5 dakika	1
Denatürasyon :	95°	95°	95°	95°	95°	95°	1 dakika	33
Annealing :	60°	58°	58°	56°	58°	56°	1 dakika	
Elongasyon :	72°	72°	72°	72°	72°	72°	1 dakika	
Elongasyon :	72°	72°	72°	72°	72°	72°	10 dakika	1
Saklama :	4°	4°	4°	4°	4°	4°	∞	

Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülene kadar saklanmak için 4°'deki soğutucuya kaldırıldı.

3.2.6 PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

PCR ürünleri %5 oranında Ethidium Bromür içeren %3'lük Agaroz jelde UV ışık kaynağı aracılığı ile görüntülendi. Bunun için önce 3 gr agaroz tartıldı ve 100ml 1x TBE solüsyonuna eklendi. Mikrodaga fırında 30 saniyede bir karıştırılarak pişirildi. Tamamen şeffaflaşan çözeltiye 5µl Ethidium Bromür eklendi ve karıştırıldı. Çeker ocakta, hava kabarcığı kalmayana ve ısı düşene kadar bekletildi. Elde edilen jel uygun sayıda kuyu içeren tarak yerleştirilmiş olan jel tablasına döküldü. Tamamen donmuş olan jel, tablasıyla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünlerinin gösterilmesi için, birinci kuyuya 1µl marker DNA, 1µl 6x Jel Yükleme Tamponu ve 4µl distile sudan oluşan karışım yüklendi. Diğer kuyulara 5µl PCR ürünü ve 1µl "6x Jel Yükleme Tamponu"ndan oluşan karışımlar yüklendi. Elektroforezde 80 voltta 60

dakika yürütüldü. Bu sürenin sonunda jel UV görüntü analizi sisteminde görüntülendi ve resimlendi.

3.2.7 Enzimle Kesim

Çalışmada taranan 7 nokta mutasyonu, PCR yöntemiyle amplifiye edilmiş 4 DNA fragmanının ilgili restriksiyon enzimleriyle kesilmesiyle denetlendi.

Fragman 1'e ait PCR ürünleri MboI, Alw21I, PstI ve AciI enzimleriyle kesilerek sırasıyla E6 Cluster, V281L, Q318X ve R356W mutasyonları açısından değerlendirildi.

Fragman 2'nin AluI enzimiyle kesilmesi sonucunda IVS2-13A/C mutasyonu, Fragman 3'ün BseI I enzimiyle kesilmesi sonucunda I172N mutasyonu ve Fragman 4'ün AciI enzimiyle kesilmesi sonucunda da P30L mutasyonu denetlendi.

Enzimle kesim için 10µl PCR ürününe, restriksiyon enzimin üreticisinin önerdiği miktarlarda buffer, distile su ve enzim karışımı eklendi ve bu karışım enzimin çalışma ısısında 16 saat inkübe edildi. Kesim ürünleri agaroz jelde görüntülene kadar 4°' lik soğutucuda saklandı.

Enzimle kesim çalışmaları bileşenleri ve ilgili ısılar Tablo 8' de gösterilmiştir.

Tablo 8. RFLP' de kullanılan bileşenlerin miktarları.

Fragman	Mutasyon	Enzim	Isı	Tanıma Bölgesi	Bileşenlerin Miktarları				
					Enzim	Buffer	PCR	dH2O	BSA
F1	E6 Cluster	MboI	37°	GATC	1µl	2µl	10µl	18µl	-
F1	V281L	Alw21I	37°	GTGCT	1µl	2µl	10µl	18µl	-
F1	Q318X	PstI	37°	CTGCA	0,7µl	3µl	10µl	16µl	0,3µl
F1	R356W	AciI	37°	CCGC	1µl	2µl	10µl	18µl	-
F2	IVS2	AluI	37°	AGCT	1µl	2µl	10µl	18µl	-
F3	I172N	BseII	65°	ACTGGN	1µl	2µl	10µl	18µl	-
F4	P30L	AciI	37°	CCGC	1µl	2µl	10µl	18µl	-

3.2.8 Restriksiyon Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Analizi

Enzim kesim ürünleri, Ethidium Bromür ile hazırlanmış %3' lük agaroz jelde görüntülendi. Agaroz jel yukarıda açıklandığı gibi hazırlandı, örnekler yüklendi ve yürütüldü. Enzimle kesim sonrası normal ve mutant allellere ait beklenen DNA fragmanları Tablo 9' da gösterilmiştir.

Tablo 9. Enzimle kesim ürünlerinin beklenen DNA segment uzunlukları.

Fragman (bp)	Mutasyon	Enzim	Enzimle Kesim Sonrası DNA Segment Uzunlukları	
			Wild Type	Homozigot Mutant
F1	E6 Cluster	MboI	349,336 ,332,257,183	685 ,332,257,183
F1	V281L	Alw21I	991 ,205, 170 ,91	1161 ,205,91
F1	Q318X	PstI	584,300, 298,154 ,121	584, 452 ,300,121
F1	R356W	AciI	420,272, 189 ,166,131,65, 56,55,34, 30 ,12,10,9,8	420,272, 219 ,166, 131,65, 56,55,34, 12,10,9,8
F2	IVS2	AluI	60, 51 ,15	60, 34,17 ,15
F3	I172N	BseII	231 ,95	217 ,95, 14
F4	P30L	AciI	464,167, 153,43 ,27	464, 196 ,167,27

3.2.9 MLPA

MLPA çalışması için MRC Holland firmasının ürettiği **SALSA MLPA KIT P050-B2 CAH** (Lot0408) kiti kullanıldı. Kit içinde CYP21A2, CYP21A1P, TNXB, C4A, C4B ve CREBL1 genlerine yönelik hazırlanmış problar bulunmaktaydı (Tablo 11).

33 probdan oluşan setin 14'ü KAH lokusunu kapsamaktaydı.

Bunlardan 5 prob CYP21A2' ye özgü problemlerdi (Tablo 8). Bu 5 probdan Ekzon 1, 3, 4, 6 ve 8' e yönelik hazırlanmış olanlar bu lokuslardaki 4 mutasyonun "Wild Type" DNA dizisine göre tasarlanmıştı (Tablo 10).

Tablo 10. Ekzon 1, 3, 4, 6 ve 8' e yönelik hazırlanmış problar, ilgili mutasyonlar

Prob	Uzunluk (bp)	Ekzon	Prob Özelliği
CYP21A2 probe 4804-L4179	202	Cyp21A2 Ekzon 1	-
CYP21A2 probe 1974-L1507	172	Cyp21A2 Ekzon 3	Wild Type 8-bp del
CYP21A2 probe 1975-L1508	211	Cyp21A2 Ekzon 4	Wild Type I172N
CYP21A2 probe 1976-L1509	229	Cyp21A2 Ekzon 6	Wild Type E6 Clust
CYP21A2 probe 5477-L4895	283	Cyp21A2 Ekzon 8	Wild Type Q318X

KAH lokusuyla ilişkili 14 probun kalan 9 tanesini C4A Ekzon 17, C4B ekzon 10, TNXB Ekzon 32, TNXB ekzon 15, TNXB ekzon 1, CREBL1 ekzon 1, CYP21A1P 5' ekzon 1, CYP21A1P intron 2 ve CYP21A1P ekzon 10 problemleri oluşturmaktaydı. Bu problemler lokustaki rekombinasyonlar sonucu ortaya çıkan delesyon ve duplikasyonların gösterilemesine yönelik dizayn edilmişti.

Bunlar dışında 6p21.3' e yönelik diğer 2 prob, 1 Y kromozom probu ve 16 referans probu ile toplam prob sayısı 33 olmaktadır (Tablo 11).

Tablo 11. SALSA MLPA KIT P050-B2 CAH (Lot0408) kiti prob içeriği.

	Uzunluk (nt)	SALSA MLPA problemleri	Kromozomal Pozisyon		
	64-70-76-82	Q-Fragmanları: DNA miktarını gösterir.			
	88-92-96	D-Fragmanları: Denatürasyonu gösterir.			
	100	X-Fragmanı: X kromozomuna spesifiktir.			
	105	Y-Fragmanı: Y kromozomuna spesifiktir.			
			REFERANS	DİĞER	KAH
1	130	Referans Prob 0797-L0463	5q31		
2	136	LTA probu 0662-L0158		6p21.3	
3	142	Referans Prob 4199-L3535	20q13		
4	148	Referans Prob 0594-L0011	11q13		
5	154	C4B probu 2357-L2586			C4BExon 19
6	160	Referans Prob 5266-L4649	2p22		
7	166	Referans Prob 1565-L1137	22q26		
8	172	CYP21A2, probu 1974-L1507			Exon 3
9	178	C4A probu 4802-L4177			C4AExon 17
10	184	Referans Prob 2516-L1947	17q11.2		
11	193	Referans Prob 0486-L0083	11p13		
12	202	CYP21A2, probu 4804-L4179			Exon 1
13	211	CYP21A2, probu 1975-L1508			Exon 4
14	220	Referans Prob 5038-L4424	9p13		
15	229	CYP21A2, probu 1976-L1509			Exon 6
16	238	UTY probu 1071-L0464		Chr. Y	
17	247	Referans Prob 1604-L1186	13p		
18	256	Referans Prob 2469-L1913	15q21		
19	265	CYP21A1P probu 4805-L4180			5' exon 1
20	274	Referans Prob 2319-L1810	19p13		
21	283	CYP21A2, probu 5477-L4895			Exon 8
22	292	TNXB probu 1982-L1515			Exon 32
23	301	Referans Prob 1575-L1147	22q12		
24	310	TNXB probu 3033-L2588			Exon 15
25	319	TNXB probu1980-L1513			Exon 1
26	328	Referans Prob 1918-L1462	1q21		
27	337	CREBL1 probu 1979-L1512			CREBL1
28	346	BAK probu 1994-L0363		6p21.3	
29	355	CYP21A1P probu 4807-L4182			Exon 10
30	364	Referans Prob 1252-L0902	2p16		
31	373	Referans Prob 4362-L3782	7p		
32	382	CYP21A1P probu 4806-L4181			Intron 2
33	391	Referans Prob 2184-L1682	6q26		

Hastaya ait DNA örneğinden 1-2µl si (yaklaşık 100ng DNA) 200µl' lik PCR tüpüne aktarıldı, total hacim TE buffer ile 5µl' ye tamamlandı. Buharlaşmayı engellemek için 10µl mineral yağ eklendi ve PCR cihazına yerleştirildi. Cihazda MLPA Hibridizasyon programı başlatıldı. Bu sırada MLPA Probe Mix ve MLPA Buffer'ın her birinden 1,5 µl alınarak miks-1 hazırlandı ve 98°C 5 dakika adımından sonraki 25°C adımında PCR tüpüne eklendi. Karışım aşağıdaki programa göre PCR cihazında tutuldu. 60°C' de 16 saat bekletildi.

Hibridizasyon

1. 25°C 20 dakika (safety step)
2. 98°C 5 dakika
3. 25°C sonsuz (*Miks-1 Eklenir*)
4. 95°C 1 dakika
5. 60°C 16 saat

16 saatlik inkübasyonun tamamlanmasından önce 25µl distile su, 3µl Ligase-65 Buffer A, 3µl Ligase-65 Buffer B ve 1µl Ligase-65' den oluşan Ligase-65 Miksi (miks-2) (32µl) hazırlandı. Hazırlanan miks PCR cihazı 54°C' ye gelince PCR tüpüne eklendi. Aşağıdaki programa göre devam edildi. Reaksiyon tamamlanınca Ligasyon ürünleri 4°C' ye ya da -20°C' ye kaldırıldı.

Ligasyon

6. 54°C sonsuz (*Mik-2 Eklenir*)
7. 54°C 15 dakika
8. 98°C 5 dakika
9. 4°C sonsuz

Yeni PCR tüpü hazırlandı. Bu tüpe 26µl distile su ve 4µl SALSA Buffer eklendi. 30µl' lik bu karışıma 10µl Ligasyon ürünü eklendi ve karıştırıldı. Bu sırada 5,5 distile su, 2 SALSA Primer, 2 SALSA enzyme Dilution Buffer ve 0,5 SALSA Poimeraz' dan oluşan miks-3 hazırlandı. PCR cihazı 60°C' ye gelince tüpteki Ligasyon Ürünü - Buffer karışımına miks-3 eklendi. PCR programı aşağıdaki gibi sürdürüldü.

PCR

10. 60°C sonsuz (*Mik-3 Eklenir*)
 11. 95°C 30 saniye
 12. 60°C 30 saniye
 13. 72°C 1 dakika
 14. 72°C 20 dakika
 15. 4°C sonsuz
- } 35 kez

Reaksiyon tamamlanınca ürünler 4°C' ye stoklandı.

3.2.10 MLPA Ürünlerinin Kapiller Elektroferezde Yürütülmesi ve Analizi

MLPA işlemi sonucunda elde edilen pcr ürünleri Beckman Coulter CEQ8800 kapiller elektroforez cihazına yüklendi. Her bir örnek için 1µl PCR ürünü, 1µl SS600 (Beckman Coulter Size Standart) ve 38µl SLS (Beckman Coulter Sample Loading Solution) karışımıyla kuyuya yüklendi. CEQ8800 cihazında 50°C kapiller ısısında, 90°C 9saniye denatürasyonda, 2KV' de 60 saniye injeksiyon süresinde ve 4,8 KV' de 60 dakika yürütme süresinde örnekler yürütüldü. İşlem sonucunda CEQ programında her bir örneğe ait problemlerin pik görüntüleri ve pik alanları elde edildi.

Elde edilen verilen analizi için excel tabanlı Coffalyser 9.4 programı kullanıldı. CEQ programından elde edilen prob uzunluğu, pik yüksekliği ve alan bilgileri non spesifik pikler kaldırılarak, her bir hasta ve 4 normal kontrol için Coffalyser' a yüklendi. Non spesifik pikler kaldırılırken MLPA kiti prob miksinin standart pikleri dikkate alındı. Analiz CEQ programından elde edilen veri dosyalarının Coffalyser programına hasta örnekleri ve referans örnekleri şeklinde tanıtılmasıyla başladı. Elde edilen verilerden DNA konsantrasyonu (64bp, 72bp, 76bp ve 82bp), Ligasyon ve Denatürasyon (88bp, 92bp ve 96bp) işlemlerinin kontrolünü sağlayan pikler değerlendirildi. Her bir prob uzunluğuna göre veriler filtre edildi. Elde edilen veriler programın "Tumor Analysis" metoduyla analiz edildi. Bu metodda slope doğrulama için tüm problemler kullanılmakta fakat referans problemler ile normalize edilmekteydi (44).

Her bir örneğe ait problemlerin relatif pik alanı (Relative Peak Area-RPA) elde edilmek üzere her prob alanı o örneğin tüm pik alanları toplamına bölünmekteydi.

Relatif pik oranı (Relative Reak Ratio-RPR) elde etmek için RPA, kontrollerden elde edilen ortalama RPA' ya bölünmektaydı. RPR sonuçları 0,7 altında delesyon, 1,3 üstünde duplikasyon (gain) düşündürmektaydı. 0,7-1,3 arasındaki RPR değerleri normal kabul edilmektaydı. Elde edilen verilerden olasılık bilgisine ulaşabilmek için RPR sonuçları Gaussian dağılım gösteren dağılım tablosuna yerleştirilmektaydı. Bunun sonucunda elde edilen RPR' nin anlamı (Prediction) belirlenmektaydı. Bir probun RPR' si 0,7' nin altında ya da 1,3' ün üstünde çıkarsa da prediction sonucu normal dağılıma girebilmektaydı. Dağılımda ara değerlere sahip problemler "ambiguous" olarak tanımlanmaktaydı (25, 44).

Gene	Chr pos.	Length (bp)	21.RS
C4A probe 4802-L4177	06p21.3	178	Ambiguous (0.62)
CYP21A1P probe 4805-L4180	06p21.3	265	Ambiguous (0.36)
CYP21A1P probe 4806-L4181	06p21.3	382	Normal (0.88)
CYP21A1P probe 4807-L4182	06p21.3	355	Normal (0.93)
C4B probe 2357-L2586	06p21.3	154	Normal (0.85)
CYP21A2 probe 4804-L4179	06p21.3	202	Ambiguous (0.49)
CYP21A2 probe 1974-L1507	06p21.3	172	Ambiguous (0.57)
CYP21A2 probe 1975-L1508	06p21.3	211	Normal (0.72)
CYP21A2 probe 1976-L1509	06p21.3	229	HO Loss (0.02)
CYP21A2 probe 5477-L4895	06p21.3	283	Normal (0.91)
TNKB probe 1982-L1515	06p21.3	292	Normal (0.83)
TNKB probe 3033-L2588	06p21.3	310	Normal (0.96)
TNKB probe 1980-L1513	06p21.3	319	Normal (0.77)
CREBL1 probe 1979-L1512	06p21.3	337	Normal (1.05)
Reference probe 1918-L1462	01q21	328	Normal (1.11)
Reference probe 1252-L0902	02p16	364	Normal (0.89)
Reference probe 5266-L4649	02p22.3	160	Normal (1.01)
Reference probe 0797-L0463	05q31	130	Normal (1.03)
Reference probe 0662-L0158	06p21.3	136	Normal (1.07)
Reference probe 1994-L0363	06p21.3	346	Normal (0.98)
Reference probe 2184-L1682	06q26	391	Normal (1.29)
Reference probe 4362-L3782	07p	373	Normal (0.93)
Reference probe 5038-L4424	09p13	220	Normal (1.05)
Reference probe 0486-L0083	11p13	193	Normal (0.96)
Reference probe 0594-L0011	11q13	148	Normal (0.75)
Reference probe 1604-L1186	13p	247	Normal (0.99)
Reference probe 2469-L1913	15q21	256	Normal (1.07)
Reference probe 2516-L1947	17q29	184	Normal (1)
Reference probe 2319-L1810	19p13	274	Normal (0.93)
Reference probe 4199-L3535	20q13	142	Normal (0.92)
Reference probe 1575-L1147	22q12	301	Normal (0.97)
Reference probe 1565-L1137	22q26	166	Normal (1.13)

Şekil 14. Coffalyser prediction sonucu örneği.

PCR-RPLP' de Ekzon 6'da E6 Cluster homozigot mutasyonu saptanmış bir hastaya ait MLPA Coffalyser Prediction sonucunun görüntüsü. CYP21A2 Ekzon 6 E6 CLUSTER mutasyonuna özgü probdu. Bu mutasyon varlığında prob hedef DNA' ya hibridize olamadığından MLPA analizinde prob 0,02 RPR ile delesyon göstermektaydı. Ayrıca 4 prob 0,62, 0,36, 0,49 ve 0,57 RPR değerleri ile delesyon düşündürsede Gaussian dağılım ile prediction sonucunda ambiguous olarak tanımlanmaktaydı.

3.2.11 Kullanılan Kimyasal Maddeler

DNA izolasyonu için ;

1. Periferik kandan DNA İzolasyon kiti (Roche High Pure Template Preparation Kit)
2. İzopropanol (MERCK)
3. Etanol (MERCK)

PCR için ;

1. 9 Primer (AlphaDNA) Liyofilize halden 1600ng/μl konsantrasyonda olacak şekilde sulandırılıp stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyondan 160ng/μl konsantrasyonda olacak şekilde working solüsyon hazırlandı.
2. Taq DNA polimeraz, Taq Buffer ve MgCl₂ (Fermentas-Bio)
3. dNTP miks (Fermentas) Stok dNTP solüsyonu her biri 100mM konsantrasyondaki ATP, CTP, GTP ve TTP stok solüsyonlarından eşit miktarlarda alınıp bir birim distile su eklenerek 20mM konsantrasyonda hazırlandı. Stok dNTP solüsyonun sulandırılarak 2 mM' lık working solüsyon elde edildi.
4. Distile Su

RFLP için ;

1. Mbo I Restriksiyon Enzimi (Fermentas)
2. Alw21 I Restriksiyon Enzimi (Fermentas)
3. Pst I Restriksiyon Enzimi (Fermentas)
4. Aci I Restriksiyon Enzimi (Fermentas)
5. Alu I Restriksiyon Enzimi (Fermentas)
6. Bse1 I Restriksiyon Enzimi (Fermentas)

Agaroz jel ve Jel Görüntülenmesi

1. Agaroz (Sigma)
2. Ethidium bromide (Sigma)
3. Marker DNA (Fermentas-Gene Ruler 50 bp DNA ladder)

4. 10X gel loading dye (Fermentas)
5. Trizma bazı (Sigma)
6. Borik asit (AppliChem)
7. EDTA (Sigma)

MLPA ve MLPA Ürünlerinin Kapiller Elektroforezde Yürütülmesi İçin

1. SALSA MLPA KIT P050-B2 CAH (Lot0408) Kit
2. TE Buffer
3. Mineral Yağ
4. Size standart 600 (Beckman Coulter)
5. Sample Loading Solution (Beckman Coulter)
6. Kapiller Elektroforez Jeli (Beckman Coulter)

3.2.12 Kullanılan Alet ve Cihazlar

1. Elektronik terazi (Precisa)
2. pH metre (Jenway)
3. Santrifüj (Nüve)
4. Soğutmalı santrifüj (Hermle)
5. Spektrofotometre (Jenway Genova)
6. Mikroskop (Olympus BX2)
7. Mikroskop (Olympus BX51)
8. Kromozom Görüntüleme ve Analiz Sistemi (Applied Imaging, CytoVision)
9. Otomatik mikropipetler 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Boeco)
10. Mikropipet uçları 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Corning)
11. 0,5 ml'lik ependorf tüpü
12. 2 ml'lik ependorf tüpü
13. Su banyosu (Nüve)
14. Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Falc)
15. Thermal cycler (Thermo-Quanta Biotech)
16. Electrophoretic gel system (Bio-Rad)
17. Derin dondurucu (Sanyo)

18. Jel görüntüleme ve analiz sistemi (Vilber Lourmat)
19. Cam beher
20. Cam mezür
21. Cam şale
22. Plastik pastör pipeti

3.2.13 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Fiksatif solüsyonu

1 kısım asetik asit / 3 kısım metanol

Hipotonik solüsyonu

5,6 gr KCl / 1000 ml distile su

Tripsin solüsyonu

40 mg tripsin / 80 ml PBS

Boya solüsyonu :

A solüsyonu: 9,10 gr/L KH_2PO_4

B solüsyonu: 9,48 gr/L Na_2HPO_4

40ml A solüsyonu, 40ml B solüsyonu ve 5 ml Giemsa birleştirilir.

PBS :

0,2 gr KCl

0,2 gr KH_2PO_4

8 gr NaCl

0,92 gr Na_2HPO_4 (1 litre distile suda çözülür)

20XSSC :

175,3 gr NaCl

88,2 gr Na Sitrat

Toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlanır.

2XSSC : 100 ml 20XSSC solüsyonuna 850 ml distile su eklenir. pH NaOH ile

7,0'ye

ayarlanır. Toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlanır.

2XSSC/0,1 NP-40 yıkama solüsyonu

100 ml 20XSSC solüsyonu 850 ml distile suya eklenir. 1 ml NP-40 eklenir ve total volüm 1 lt'ye tamamlanır. pH NaOH ile 7,0'a ayarlanır.

Yıkama Solüsyonu (0,4XSSC/%0,3 NP-40 solüsyonu)

20 ml 20XSSC 950 ml distile suyla karıştırılır. Üzerine 3 ml NP-40 eklenir, pH NaOH ile 7,0'a ayarlanır.

10X TBE

108 gr Tris Base

55 gr Borik asit

40 ml 0,5 M EDTA

800 ml distile suda ısıtılarak çözündürülür ve total volüm distile su ile 1lt'ye tamamlanır.

0,5 M EDTA

186 gr EDTA 800 ml distile suda ısıtılarak çözündürülür. pH NaOH ile 8,0'e ayarlanır. Total hacim 1 lt'ye tamamlanır.

Ethidyum bromide

1 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanıp alüminyum folyoya sarılarak +4 0C'de saklanır.

4. BULGULAR

Hastalarımızın başvuru nedenleri, akrabalık öyküleri, klinik özellikleri ve gonozomal yapılanma bilgileri özetlenmiş; Moleküler genetik inceleme (PCR, RFLP ve MLPA) sonuçları sunulmuştur.

4.1 Klinik Bulgular

Başvuru öyküsü-Akrabalık

26 hastamızın 15' i kuşkulu genital yapı, 1'i pubik ve aksiller tüylenme, 1'i dış genital yapılarda hiperpigmentasyon ve 1'i yaşına göre aşırı virilize male dış genital yapı nedenleriyle hastanemize başvurmuştur. 8 hastamız ise kusma ve uzamış sarılık gibi şikayetlerle başvurmuştur.

26 hastamızın 10' unde anne baba arasında akrabalık tanımlanmaktadır. 26 hastamızın 7'sinde ise ailede benzer şekilde etkilenmiş birey tariflenmektedir. 3 hastamızda ailede erken dönemde kaybedilen bebek mevcuttur.

Fenotip-Gonozomal Yapılanma

Başvuru anındaki muayenede 16 hastamızın dış genital yapısı "kuşkulu" , 11 hastamızın dış genital yapısı erkek olarak tanımlanmıştır (Tablo 12). Kuşkulu genital yapı saptanan hastaların tümünün gonozomal yapılanması XX olarak dış genital yapısı erkek saptanan hastaların tümünün gonozomal yapılanması XY olarak saptanmıştır.

Kuşkulu genital yapı saptanan 16 hastanın 5' inde tek ortak ürogenital açıklık saptanmıştır (Tablo 12).

26 hastanın 11' inde (16 XX hastanın 6' sında 10 XY hastanın 5' inde) genital hiperpigmentasyon saptanmıştır.

26 hastanın 4' ünde KAH dışında ek anomaliler saptanmıştır. 3 hastada kardiovasküler sistemi ilgilendiren değişiklikler [1' inde (EZ) Ventriküler Septal Defekt ; 1' inde (IUS) Foramen Ovale ve Atrial Septal Anevrizma ve 1' inde (IS) Pulmoner yetmezlik ve Patent Ductus Arteriosus] ve bir hastada motor mental retardasyon saptanmıştır.

26 hastanın 15' inde başvuru anında hiponatremi saptanmıştır. Bu hastaların tümünde virilizasyon bulguları da mevcut olduğundan, hastalar tuz kaybettiren fenotip ile tanımlanmışlardır (Tablo 13).

Tablo 12. Hastaların başvuru yaşları, nedenleri ve muayene bulguları

No	Adı	Baş- Yaşı	Başvuru Nedeni	Cinsiyet Tanımlaması	Muayene Fallus?, Üretra?, Labioskrotal Füzyon?, Hiperpigmentasyon?
1	AU	11 gün	Sarılık	KGY	Fallus, Tek ortak ürogenital sinüs, Kısmi labioskrotal füzyon, Lab. Majusta Hiperpigmentasyon
2	BÜ	7 gün	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Üretra doğal yerleşimli, Labioskrotal füzyon yok, Hiperpigmentasyon yok
3	EZ	26 gün	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Fallus ventralinde tek açıklık, Kısmi labioskrotal füzyon Lab. Majusta Hiperpigment.
4	GÇ	9 yaş	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Üretra fallus tabanında, Labioskrotal Füzyon Yok, Hiperpigmentasyon yok
5	HB	2 yaş	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Fallus ventralinde tek açıklık, Kısmi labioskrotal füzyon, Hiperpigmentasyon yok
6	ÖS	1 gün	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Üretra doğal yerleşimli, Labioskrotal füzyon yok, Hiperpigmentasyon yok
7	ZŞK	1,5 yaş	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Üretra doğal yerleşimli, Labioskrotal füzyon Yok, Hiperpigmentasyon yok
8	ZV	3 gün	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Üretra fallus tabanında, Kısmi labioskrotal füzyon, Labium Majusta Hiperpigmentasyon
9	ÖT	16 ay	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Üretra fallus tabanında, kısmi labioskrotal füzyon, Hiperpigmentasyon yok
10	ANŞ	5 gün	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Üretra fallus tabanında, kısmi labioskrotal füzyon, Hiperpigmentasyon yok
11	AÖ	5 ay	Kusma	Erkek	Penis, Üretra doğal yerleşimli, Skrotum mevcut, Skrotal Hiperpigmentasyon
12	HG	1 ay	Genital hiperpigmentasyon	Erkek	Penis, Üretra doğal yerleşimli, Skrotum mevcut, Skrotal Hiperpigmentasyon
13	HY	39 gün	Kusma	Erkek	Penis, Üretra doğal yerleşimli, Skrotum mevcut, Skrotal Hiperpigmentasyon
14	HA	5 ay	Kusma	Erkek	Penis, Üretra doğal yerleşimli, Skrotum mevcut, Hiperpigmentasyon yok
15	IUS	2yaş	Hipervirilize male dış genital	Erkek	Penis, Üretra dorsale yakın yerleşimli, Skrotum mevcut, Hiperpigmentasyon yok
16	MTK	15 saat	Kusma	Erkek	Penis, Üretra doğal yerleşimli, Skrotum mevcut, Hiperpigmentasyon yok
17	MYA	2ay	Kusma	Erkek	Penis, Üretra doğal yerleşimli, Skrotum mevcut, Hiperpigmentasyon yok
18	ErK	2gün	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Üretra fallus tabanında, Kısmi labioskrotal füzyon, Fallik Hiperpigmentasyon
19	RS	1ay	Kusma	Erkek	Penis, Üretra doğal yerleşimli, Skrotum mevcut, Labioskrotal Hiperpigmentasyon
20	FA	17 yaş	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Üretra fallus tabanında, kısmi labioskrotal füzyon, Hiperpigmentasyon yok
21	İŞ	1gün	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Üretra fallus tabanında, Kısmi labioskrotal Füzyon, Labioskrotal Hiperpigmentasyon
22	HS	18gün	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Fallus tabanında tek açıklık, Kısmi labioskrotal füzyon, Hiperpigmentasyon yok
23	DAK	1gün	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Üretra fallus tabanında, kısmi labioskrotal füzyon , Hiperpigmentasyon yok
24	AK	1ay	Sarılık	Erkek	Penis, Üretra doğal yerleşimli, Skrotum mevcut, Hiperpigmentasyon yok
25	OAt	(10y)	Pubik-Aksiller Kılınma	Erkek	Penis, Üretra doğal yerleşimli, Skrotum mevcut, Hiperpigmentasyon yok
26	BÇ	2gün	Kuşkulu Genital Yapı	KGY	Fallus, Fallus tabanında tek açıklık, Kısmi labioskrotal füzyon, Labioskrotal Hiperpigmentasyon

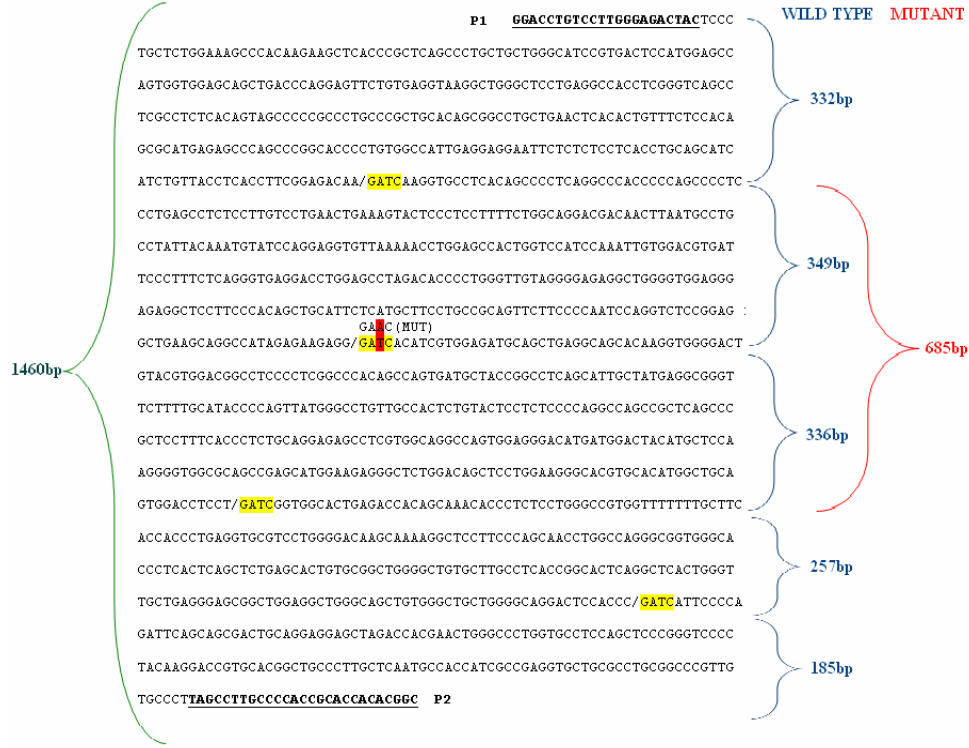
4.2 Moleküler Genetik Sonuçlar

4.2.1 RFLP Sonuçları

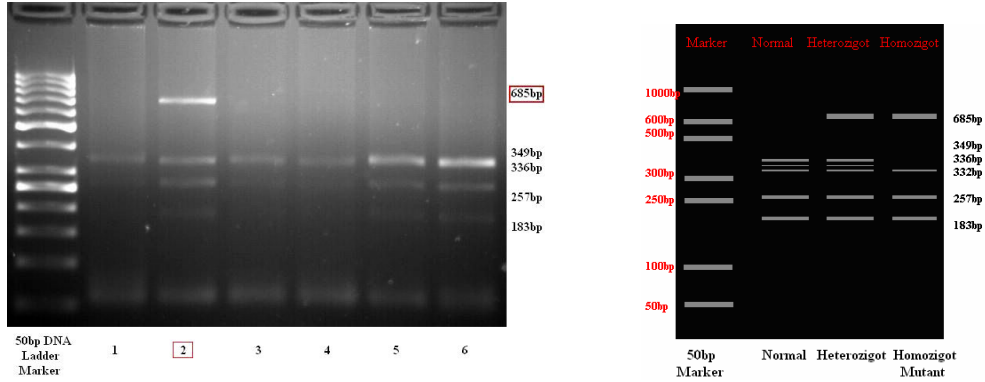
Enzimle kesim sonrası elde edilen DNA fragmanlarının uzunlukları wild type, homozigot mutant ya da heterozigot tanımlamasının yapılmasını sağladı.

Amplifiye edilen **Fragman 1'** de 4 allele ilişkili mutasyon bakıldı. *E6 Cluster (I236N/V237E/M239K)* (*Şekil 16*), *V281L* (*Şekil 17*), *Q318X* (*Şekil 18*) ve *R356W* (*Şekil 19*) mutasyonlarının varlığı durumunda ilişkili restriksiyon enzimlerinin (MboI, Alw21I, PstI ve AclI) bir tanıma bölgesi kaybolmaktaydı. Bu durumda enzimle kesim ürünlerindeki iki fragmanın yerine onların toplam uzunluklarından oluşan tek bir fragman saptanmaktaydı. Benzer şekilde **Fragman 4'** te de *P30L* (*Şekil 20*) mutasyonunun varlığında AclI enziminin bir enzim tanıma bölgesi yok olmaktaydı.

Şekil 15' de E6 Cluster mutasyonlarının taranması için gerçekleştirilen PCR ürününün DNA dizisi görülmektedir (Fragman 1). 1460bp'lik bu fragmanın GATC dizininden tanınıp MboI enzimiyle kesimi sonucu ortaya çıkan DNA fragmanları 349bp, 336bp ,332bp ,257bp ve 183bp' şeklindedir. E6 Cluster I236N mutasyonu (ATC'den AAC'ye dönüşüm mutasyonu) sonucunda bir enzim tanıma bölgesini kaybedilmekte ve 349bp ve 336bp' lik iki fragman yerine 685bp lik tek fragman gözlenmektedir.

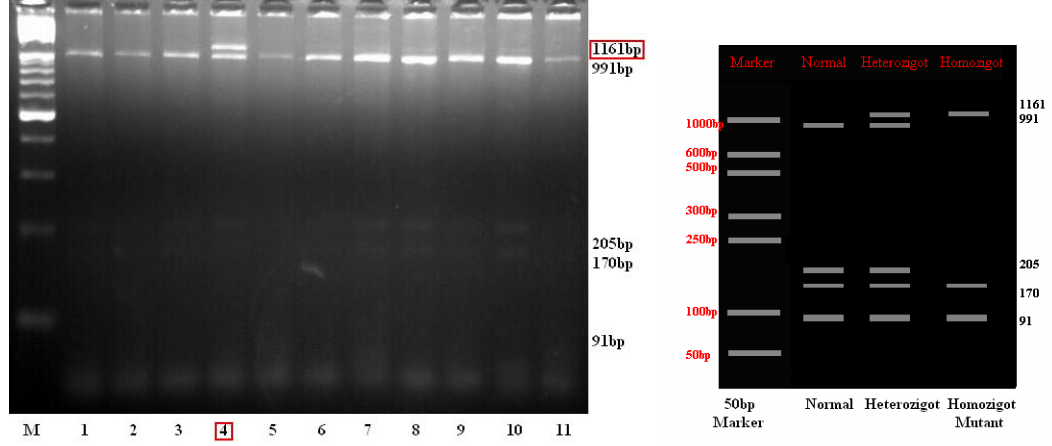


Şekil 15. E6 Cluster I236N mutasyonunun enzimle kesim yöntemiyle gösterilmesi.

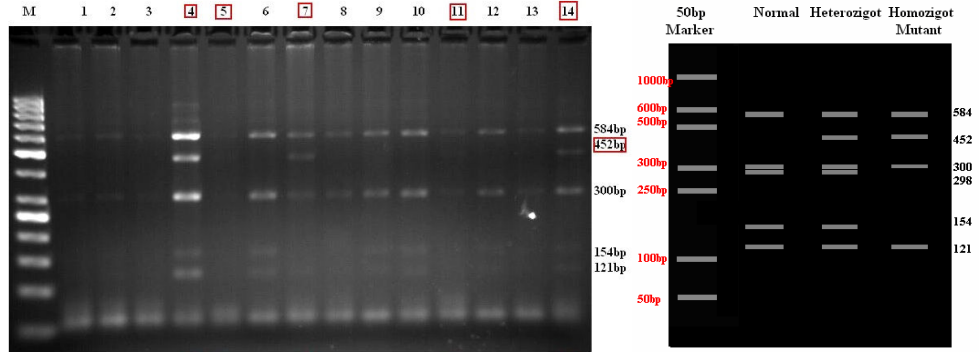


Şekil 16. CYP21 Geninin Fragman 1 PCR ürününün E6 Cluster mutasyonunun incelenmesi için MboI enzimiyle kesim görüntüsü (A. Jel' de yürütme görüntüsü B. Şematik Çizim) E6 Cluster mutasyonunun incelenmesi için PCR ürünü MboI enzimiyle kesildiğinde wild type ise 349,336,332,257,183 baz çift' lik 5 bant, homozigot mutant ise 685,332,257,183 baz çift' lik 4 bant ve heterozigot ise 685,349,336,332,257,183 baz çift' lik 6 bant görülmektedir.

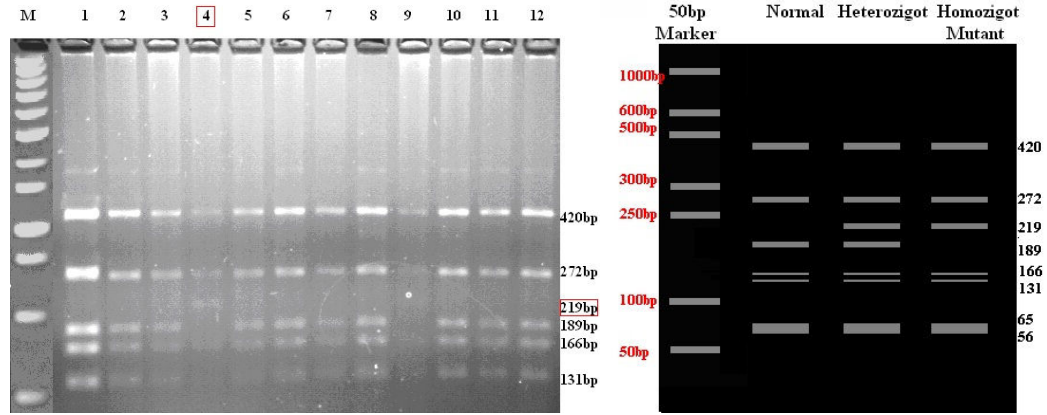
Fragman 1' in diğer mutasyonlarla ilgili enzimle kesim jel görüntüleri:



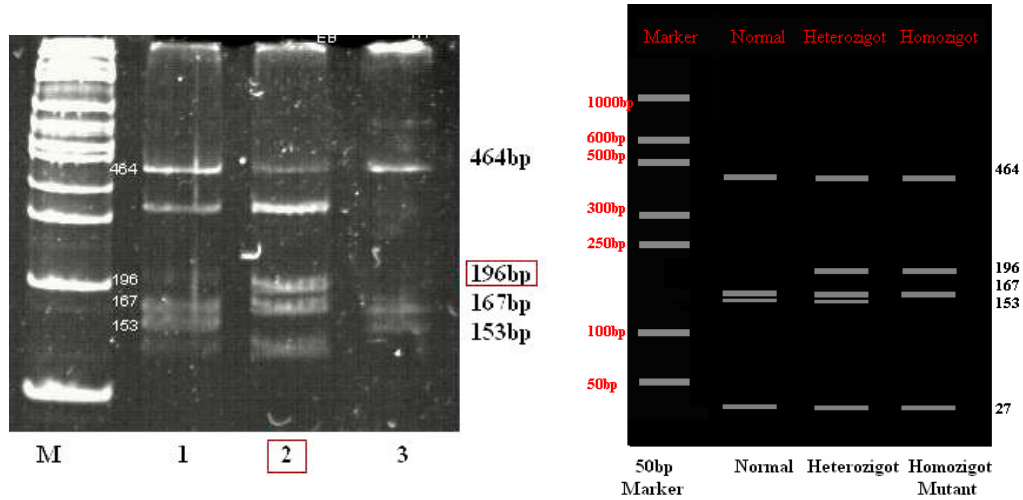
Şekil 17. CYP21 Geninin Fragman 1 PCR ürününde V281L mutasyonunun incelenmesi için Alw21I Enzimiyle kesim görüntüsü (A. Jel' de yürütme görüntüsü B. Şematik Çizim) V281L mutasyonunun incelenmesi için PCR ürünü Alw21 enzimiyle kesildiğinde wild type ise 991,205,170,91 baz çift' lik 4 bant, homozigot mutant ise 1161,205,91 baz çift' lik 3 bant, heterozigot ise 1161,991,205,170,91 baz çift' lik 5 bant görülmektedir.



Şekil 18. CYP21 Geninin Fragman 1 PCR ürününde Q318X mutasyonunun incelenmesi için PstI enzimiyle kesim görüntüsü (A. Jel' de yürütme görüntüsü B. Şematik Çizim) Q318X mutasyonunun incelenmesi için PCR ürünü PstI enzimiyle kesildiğinde wild type ise 584,300,298,154,121 baz çift' lik 5 bant, homozigot mutant ise 584,452,300,121 baz çift' lik 4 bant, heterozigot ise 584,452,300,298,154,121 baz çift' lik 6 bant görülmektedir.

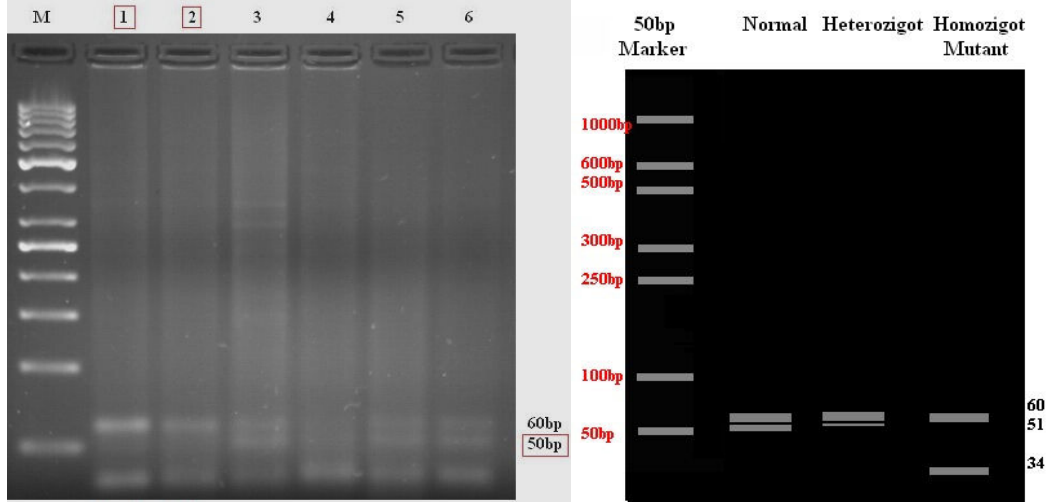


Şekil 19. CYP21 Geninin Fragman 1 PCR ürününün R356W mutasyonunun incelenmesi için *Acil* enzimiyle kesim görüntüsü (A. Jel' de yürütme görüntüsü B. Şematik Çizim) R356W mutasyonunun incelenmesi için PCR ürünü *Acil* enzimiyle kesildiğinde wild type ise 420,272,189,166,131,65, 56,55,34,30,12,10,9,8 baz çift' lik bantlar, homozigot mutant ise 131,65, 56,55,34, 12,10,9,8 baz çiftlik bantlar görülmektedir.

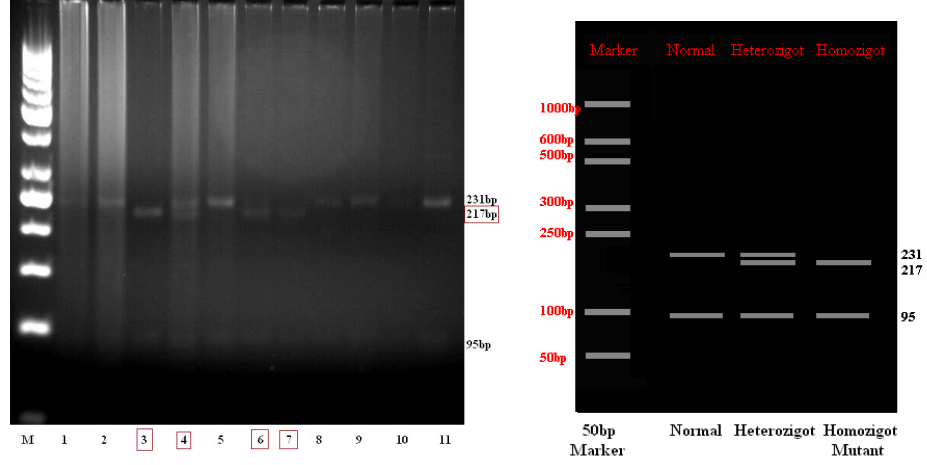


Şekil 20. CYP21 Geninin Fragman 4 PCR ürünüde P30L mutasyonun incelenmesi için *Acil* enzimiyle kesim görüntüsü (A. Jel' de yürütme görüntüsü B. Şematik Çizim) P30L mutasyonunun incelenmesi için PCR ürünü *Acil* enzimiyle kesildiğinde wild type ise 464,167,153,43,27 baz çift' lik bantlar, homozigot mutant ise 464,196,167,27 baz çiftlik bantlar görülmektedir.

Fragman 2 ve **Fragman 3'** de *IVS2* (Şekil 21), *I172N* (Şekil 22) sırasıyla AluI ve BseII enzimleri için yeni bir enzim tanıma bölgesi yaratmakta, o noktadaki bir fragman iki daha küçük fragmana ayrılmaktaydı.



Şekil 21. CYP21 Geninin Fragman 2 PCR ürününün AluI Enzimiyle Kesim Görüntüsü (A. Jel' de yürütme görüntüsü B. Şematik Çizim) *IVS2* mutasyonunun incelenmesi için PCR ürünü AluI enzimiyle kesildiğinde wild type ise 60,51,15 baz çift' lik bantlar, homozigot mutant ise 60,34,17,15 baz çiftlik bantlar görülmektedir.



Şekil 22. CYP21 Geninin Fragman 3 PCR ürününün BseI Enzimiyle Kesim

Görüntüsü (A. Jel’ de yürütme görüntüsü B. Şematik Çizim) I172N mutasyonunun incelenmesi için PCR ürünü BseI enzimiyle kesildiğinde wild type ise **231,95** baz çift’ lik bantlar, homozigot mutant ise **217,95,14** baz çiftlik bantlar görülmektedir .

Çalışmamızda CYP21 genotipleri incelenen 26 hastadan 25’ inde nokta mutasyonu ya da delesyon saptanmıştır (%96.1). Mutasyonlar 25 hastanın 18’ inde **homozigot** (1’ inde *E6 Cluster*, 3’ ünde *Q318X*, 2’ sinde *R356W*, 4’ ünde *IVS2*, 2’ sinde *I172N* ve 6’ sında *geniş delesyon*) 3’ ünde **“compound heterozigot”** (1’ inde *Q318X/I172N*, 1’ inde *V281L/P30L* ve 1’ inde *Q318X/P30L*) ve 4’ ünde **heterozigot** (1’ inde *V281L*, 1’ inde *Q318X*, 3’ ünde *I172N*) formda bulunmuştur. İncelenen allellerin içinde **en yüksek oranda (%23) geniş delesyon saptanmıştır**. Daha sonra sırasıyla %17,3 oranında *Q318X* , %15,3 oranında *nt656g (IVS2)*, %15,3 oranında *I172N*, %7,7 oranında *R356W*, %3,8 oranında *P30L*, %3,8 oranında *E6 cluster* ve %1,9 oranında *V281L* mutasyonları gelmektedir. 8-bp delesyonu saptanmamıştır.

Saptanan mutasyonlar fenotipik ağırlıklarına göre genotipik klasifikasyonla (Tablo 3) yorumlanmıştır.

Tablo 13. Tuz kaybettiren fenotipli hastaların başvuru nedenleri, ilk bulguları ve genotipleri.

		Na (135-145) mEq/L	K (3,5-5,5) mEq/L	Başvuru Nedeni	Dış Genitalya	Saptanan Mutasyon
1	AU	128	7	Uzamış Sarılık	Kuşkulu Genital Yapı Fallus-Ürogenital sinüs	Homozigot IVS2 Ağır (Tip-A)
3	EZ	131	7,57	Kuşkulu Genital Yapı	Kuşkulu Genital Yapı Fallus-Tek açıklık	Homozigot Geniş Delesyon Ağır (Tip-A)
6	OS	131	4,94	Kuşkulu Genital Yapı	Kuşkulu Genital Yapı Fallus	Homozigot Q318X Ağır (Tip-A)
8	ZV	123	9,3	Kuşkulu Genital Yapı	Kuşkulu Genital Yapı Fallus	Homozigot Geniş Delesyon Ağır (Tip-A)
10	ANŞ	133	5,1	Kuşkulu Genital Yapı	Kuşkulu Genital Yapı Fallus-Tabanda üretra	Homozigot Q318X Ağır (Tip-A)
11	AÖ	121	6	Kusma	Male dış genitalya Skrotal Hiperpigment.	Homozigot R356W Ağır (Tip-A)
13	HY	118	8	Kusma	Male dış genitalya Skrotal Hiperpigment.	Heterozigot Q318X Ağır (Tip-A)
14	HA	120	5,6	Kusma	Male dış genitalya	Homozigot IVS2 Ağır (Tip-A)
17	MYA	125	5	Kusma	Male dış genitalya	Homozigot R356W Ağır (Tip-A)
18	ERK	130	6,98	Kuşkulu Genital Yapı	Kuşkulu Genital Yapı Fallus-Tabanda üretra	Geniş Delesyon Ağır (Tip-A)
19	RS	122	8,8	Kusma	Male dış genitalya Skrotal Hiperpigment.	Homozigot E6 Cl. Ağır (Tip-A)
21	İS	133	4,5	Kuşkulu Genital Yapı	Kuşkulu Genital Yapı Fallus-Tabanda üretra	Homozigot Q318X Ağır (Tip-A)
22	HS	97	7,4	Kuşkulu Genital Yapı	Kuşkulu Genital Yapı Fallus-Tek açıklık	Homozigot Geniş Delesyon Ağır (Tip-A)
23	DAK	128	4	Kuşkulu Genital Yapı	Kuşkulu Genital Yapı Fallus-Tabanda üretra	Homozigot Geniş Delesyon Ağır (Tip-A)
24	AK	123	.	Halsizlik	Male dış genitalya	Homozigot Geniş Delesyon Ağır (Tip-A)

Tablo 14. Basit virilizan fenotipli hastaların başvuru nedenleri ve genotipleri.

No	Adı	Başvuru Nedeni	Gonozomal Yapılanma	Dış Genitalya	Saptanan Mutasyon
2	BÜ	.	XX	.	-
4	GÇ	Genital anomali	XX	Fallus Üretra fallus tabanında	Homozigot I172N Orta (Tip-B)
5	HB	Genital anomali	XX	Fallus Üretra fallus tabanında	Compound Heterozigot Q318X/ I172N Ağır/Orta (Tip-A/Tip-B)
7	ZŞK	Genital anomali	XX	Fallus	Heterozigot I172N Orta (Tip-B)
9	ÖT	Genital anomali	XX	Fallus Üretra fallus tabanında	Homozigot I172N Orta (Tip-B)
12	HG	Genital hiperpig.	XY	Male dış genitalya Skrotal hiperpigmentasyon	Compound Heterozigot V281L/ P30L Hafif/Hafif (Tip-C/Tip-C)
15	IUS	Yaşına göre ileri dış genitalya	XY	Male dış genitalya, penis iri, üretra dorsale yakın	Heterozigot I172N Orta (Tip-B)
16	MTK	Emmeme,Kusma	XY	Male dış genitalya	Compound Heterozigot Q318X/ P30L Ağır/Hafif (Tip-A/Tip-C)
20	FA	Kuşkulu Genital Yapı	XX	Fallus Üretra fallus tabanında	Heterozigot I172N Orta (Tip-B)
25	OAt	Pubik-Aksiller Kıllanma	XY	Male dış genitalya	Homozigot IVS2 Ağır-Orta (Tip-A-B)
26	BÇ	Kuşkulu Genital Yapı	XX	Male dış genitalya	Homozigot IVS2 Ağır-Orta (Tip-A-B)

Tablo 15. Hasta grubunda saptanan mutasyonlar

SIRA	İSİM	F1	F1	F1	F1	F2	F3	F4	F5	F6
		<i>Mbo I</i>	<i>Alw21</i>	<i>Pst I</i>	<i>Aci I</i>	<i>Alu I</i>	<i>BseI I</i>	<i>Aci I</i>		
		E6 Cl	V281L	Q318X	R356W	IVS2	I172N	P30L	8-bp Del	Large Del
1	AU					+/+				
2	BÜ									
3	EZ									+/+
4	GÇ						+/+			
5	HB			+/-			+/-			
6	ÖS			+/+						
7	ZŞK						+/-			
8	ZV									+/+
9	ÖT						+/+			
10	AŞ			+/+						
11	AÖ				+/+					
12	HG		+/-					+/-		
13	HY			+/-						
14	HA					+/+				
15	İUŞ						+/-			
16	MTK			+/-				+/-		
17	MA				+/+					
18	ErK									+/+
19	RS	+/+								
20	FA						+/-			
21	İŞ			+/+						
22	HS									+/+
23	DAK									+/+
24	AK									+/+
25	OAt					+/+				
26	BÇ					+/+				

Tablo 16. Hasta grubunda saptanan allel frekansları.

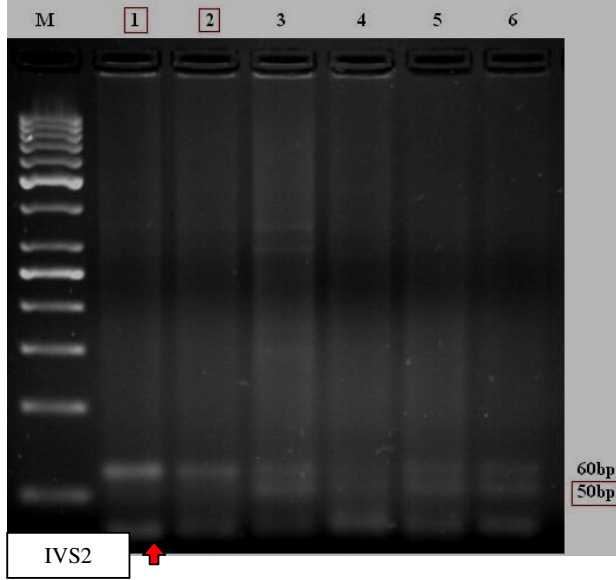
Mutasyon	Allel Sayısı	Allel Frekansı	Klinik ilişkisi
Delesyon	12	%23	Tuz kaybettiren
G110Δ8nt	-	-	Tuz kaybettiren
E6 cluster mutasyonları	2	%3,8	Tuz kaybettiren
Q318X	9	%17,3	Tuz kaybettiren
R356W	4	%7,7	Tuz kaybettiren
IVS2-13A/C→G	8	%15,3	Basit virilizan/Tuz kaybettiren
I172N	8	%15,3	Basit virilizan

V281L	1	%1,9	Non klasik
P30L	2	%3,8	Non klasik

Aşağıda mutasyon saptanan olgulara ait jel görüntüleme örnekleri sunulmuştur.

Tablo 17. AU kodlu hastada saptanan homozigot IVS2 mutasyonunun PCR ve RFLP jel görüntüsü

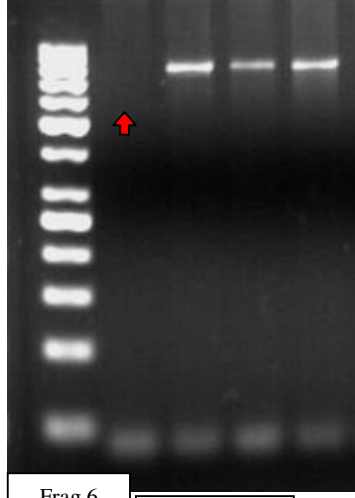
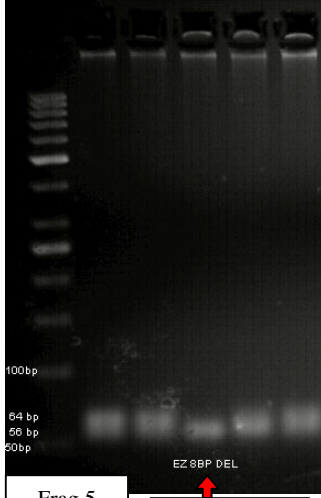
		E6 Cl	V281L	Q318X	R356W	IVS2	I172N	P30L	8-bp Del	Large Del
1	AU					+/+				



PCR-RFLP SONUCU:
 Homozigot Intron 2' de A ya da C' den G' ye dönüşüm mutasyonu saptanmıştır.
(IVS2-13A/C→G, nt656g)
 Wild Type: 60bp, 51bp, 15bp
 Homozigot Mutant: 60bp, 34bp, 17bp, 15bp

Tablo 18. EZ kodlu hastada saptanan homozigot geniş delesyonun PCR ve RFLP jel görüntüsü.

		E6 CI	V281L	Q318X	R356W	IVS2	I172N	P30L	8-bp Del	Large Del
3	EZ									+/+

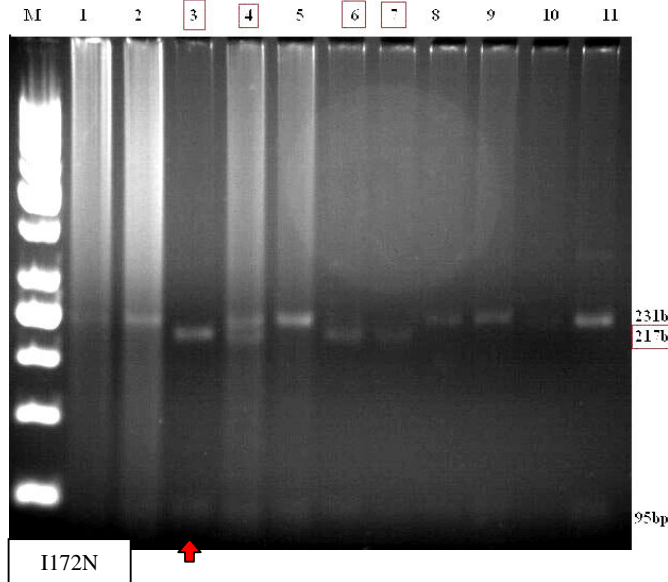


PCR SONUCU:

Fragman 5'de normal aleller için beklenen 64-bp ve 56-bp' lik fragmanlar yerine 56-bp' lik tek fragmanın görülmesi delesyon varlığını göstermekteydi. Fragman 6' PCR işleminin sonucunda 789-bp' lik ürünün görülmemesi homozigot formda **GENİŞ DELESYON** varlığını onaylamaktaydı.

Tablo 19. GC kodlu hastada saptanan homozigot I172N mutasyonunun PCR ve RFLP jel görüntüsü

		E6 CI	V281L	Q318X	R356W	IVS2	I172N	P30L	8-bp Del	Large Del
4	GC						+/+			



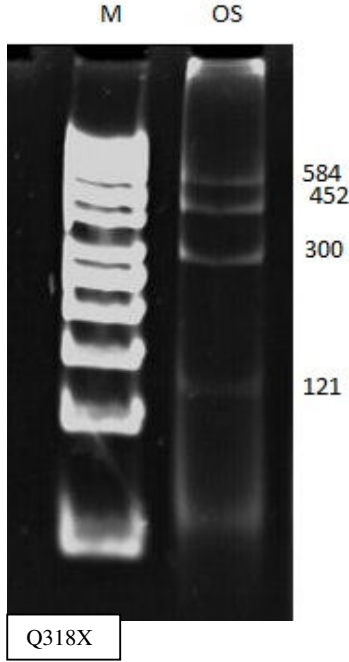
PCR-RFLP SONUCU:

Ekzon 4' de **Homozigot I172N mutasyonu** saptanmıştı.

Wild Type: 231,95
Homozigot Mutant: 217,95,14

Tablo 20. OS kodlu hastada saptanan homozigot Q318X mutasyonunun PCR ve RFLP jel görüntüsü

		E6 Cl	V281L	Q318X	R356W	IVS2	I172N	P30L	8-bp Del	Large Del
6	ÖS			+/+						

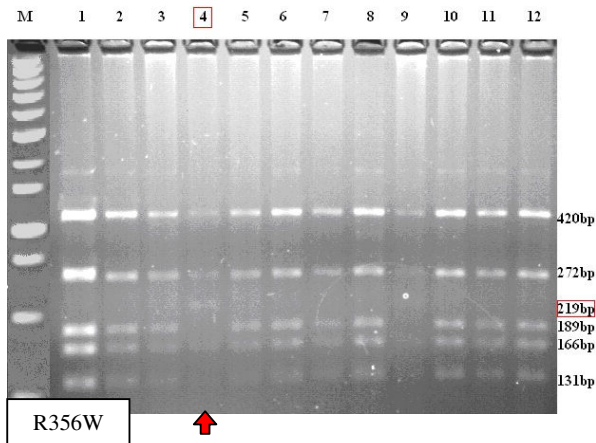


PCR-RFLP SONUCU:
Ekzon 8' de Q318X homozigot mutasyonu saptanmıştır.

Wild Type: 584,300,298,154,121
Homozigot Mutant: 584,452,300,121

Tablo 21. AO kodlu hastada saptanan homozigot R356W mutasyonunun PCR ve RFLP jel görüntüsü

		E6 Cl	V281L	Q318X	R356W	IVS2	I172N	P30L	8-bp Del	Large Del
11	AÖ				+/+					



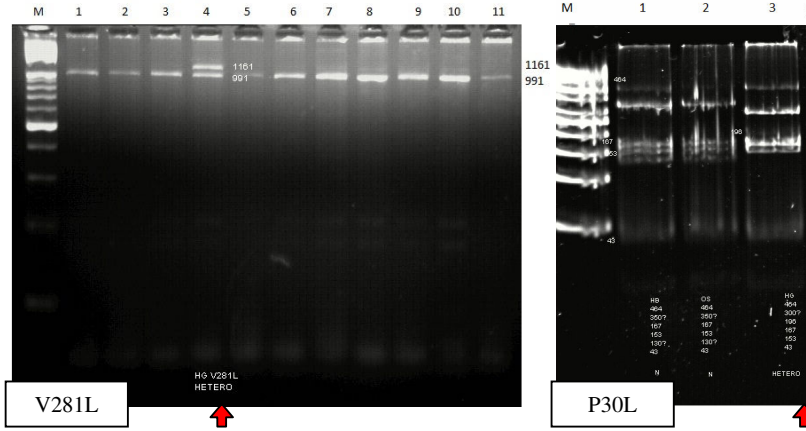
PCR-RFLP SONUCU:

Ekzon 8' de
Homozigot R356W mutasyonu
saptanmıştır.

Wild Type:
420,272,189,166,131,65, 56,55,34,30,12,10,9,8
Homozigot Mutant:
420,272,219,166, 131,65, 56,55,34,12,10,9,8

Tablo 22. HG kodlu hastada saptanan “compound heterozigot” V281L/P30L mutasyonunun PCR ve RFLP jel görüntüsü

		E6 Cl	V281L	Q318X	R356W	IVS2	I172N	P30L	8-bp Del	Large Del
12	HG		+/-					+/-		



PCR-RFLP SONUCU:

Ekzon 7’ de V281L heterozigot mutasyonu ve Ekzon 1’ de P30L heterozigot mutasyonu
“Compound Heterozigot” saptandı.

V281L

Wild Type: 991,205,170,91

Homozigot Mutant: 1161,205,91

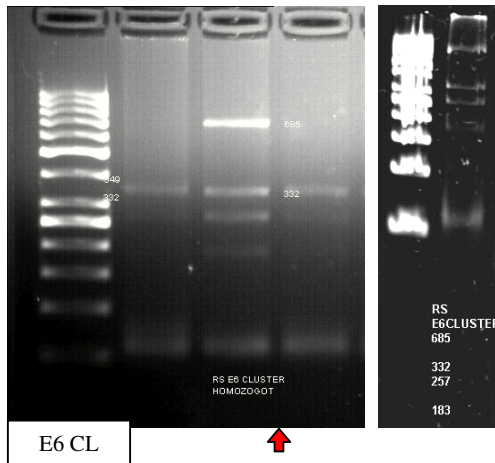
P30L

Wild Type: 464,167,153,43,27

Homozigot Mutant: 464,196,167,27

Tablo 23. RS kodlu hastada saptanan homozigot E6 CLUSTER mutasyonunun PCR ve RFLP jel görüntüsü

		E6 Cl	V281L	Q318X	R356W	IVS2	I172N	P30L	8-bp Del	Large Del
19	RS	+/+								



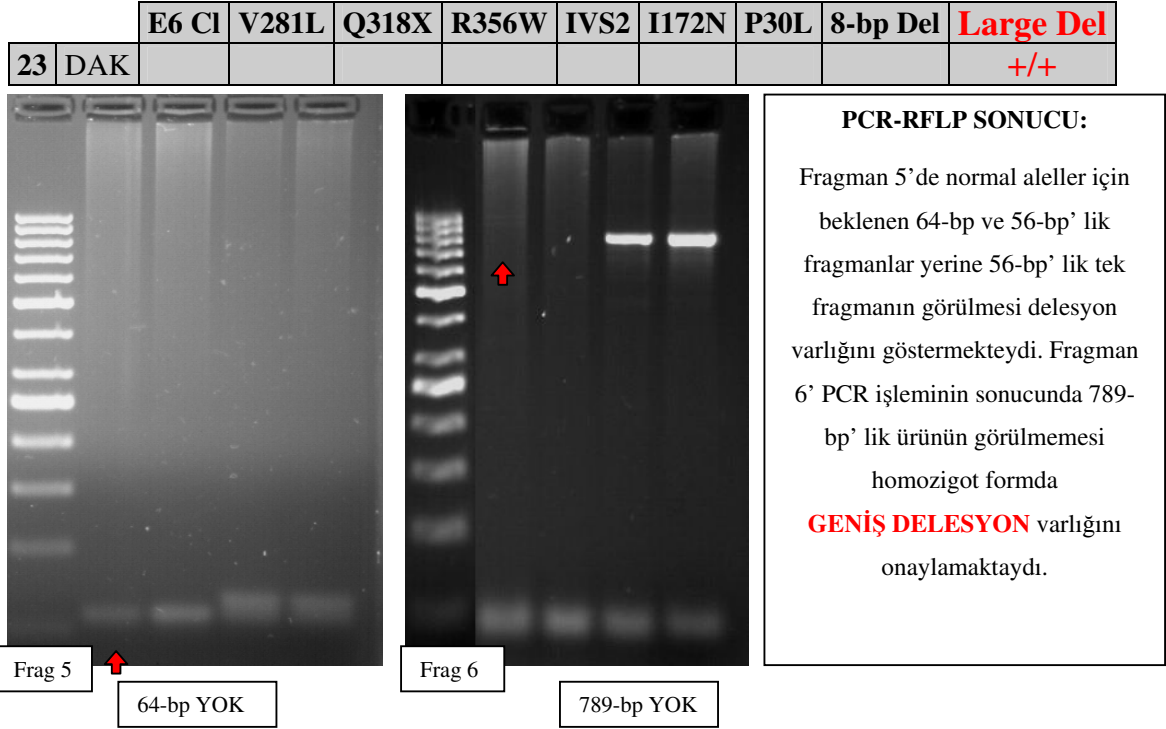
PCR-RFLP SONUCU:

Ekzon 6’ de **E6 Cluster homozigot mutasyonu** saptanmıştı.

Wild Type: 349,336,332,257,183

Homozigot Mutant: 685,332,257,183

Tablo 24. DAK kodlu hastada saptanan homozigot geniş delesyonun PCR ve RFLP jel görüntüsü



4.2.2 MLPA Sonuçları

MLPA çalışmamız, klasik moleküler genetik tanı yöntemleri olan PCR ve RFLP’ de saptanan delesyon ve mutasyonların, göreceli olarak yeni bir metod ile karşılaştırılması amacıyla ön çalışma temelinde gerçekleştirilmiş olduğumuz bir çalışmadır.

MLPA çalışması için MRC Holland firmasının ürettiği **SALSA MLPA KIT P050-B2 CAH** (Lot0408) kiti kullanıldı. Kit içinde CYP21A2, CYP21A1P, TNXB, C4A, C4B ve CREBL1 genlerine yönelik hazırlanmış problemler bulunmaktadır.

Toplam 33 probun 14 tanesi CYP21A2 geni ile ilişkiliydi. Bunların 5’i CYP21A2 geninin ekzon 1, 3, 4, 6 ve 8’ ine özgü problemlerdi. Bu problemler aynı zamanda ekzon 3’teki **8-bp delesyonu**, ekzon 4’teki **I172N**, ekzon 6’daki **E6 Cluster**, ve ekzon 8’deki **Q318X** mutasyonlarının wild type’larına göre tasarlanmışlardı. Bu şekilde bu 4 prob hem hibridize oldukları bölge hakkında delesyon-duplikasyon bilgisi hem de adı geçen mutasyonların varlığı hakkında bilgi verebilmekteydi. Kalan 9 tanesini C4A

Ekzon 17, C4B ekzon 10, TNXB Ekzon 32, TNXB ekzon 15, TNXB ekzon 1, CREBL1 ekzon 1, CYP21A1P 5' ekzon 1, CYP21A1P intron 2 ve CYP21A1P ekzon 10 problemleri. Bu problemler lokustaki delesyon ve duplikasyonların gösterilemesine yöneliktir.

PCR çalışmaları sonucunda homozigot geniş delesyona sahip olduğu saptanan EZ (Şekil 23-A), ZV, ErK, HS, DAK ve AK kodlu hastaların MLPA pik analizi ve Coffalyser Prediction Sonucu ilgili problemler için delesyon göstermekteydi. PCR yöntemiyle delesyon saptanan 6 vakanın tümünde MLPA yöntemi delesyonlar onaylamıştı. MLPA ile delesyon saptanan hastaların delesyona uğramış bölgelerin tanımlanması mümkün olmuştu. MLPA analiziyle bu bölgeler **EZ**'de C4B ekzon 19, CYP21A2 Ekzon 1, CYP21A2 Ekzon 3; **ZV**'de CYP21A2 Ekzon 1, CYP21A2 Ekzon 3, CYP21A2 Ekzon 4; **ERK**'de CYP21A2 Ekzon 1 ve CYP21A2 Ekzon 3 **HS**'de C4A Ekzon 17, CYP21A2 Ekzon 1, CYP21A2 Ekzon 3; **DAK**'de C4B Ekzon 19, CYP21A2 Ekzon 1, CYP21A2 Ekzon 3, CYP21A2 Ekzon 4, CYP21A2 Ekzon 6, CYP21A2 Ekzon 8 ve **AK**'de C4B Ekzon 19, CYP21A2 Ekzon 1, CYP21A2 Ekzon 3, CYP21A2 Ekzon 4, CYP21A2 Ekzon 6 ve CYP21A2 Ekzon 8' olarak tanımlanmıştı (Tablo 25).

Tablo 25. PCR yöntemiyle delesyon saptanmış hastaların MLPA sonuçları

SIR A	İSİ M	PCR	MLPA' da delesyon saptanan problemler
03	EZ	Geniş Delesyon	C4B ekzon 19, CYP21A2 Ekzon 1, CYP21A2 Ekzon 3
08	ZV	Geniş Delesyon	CYP21A2 Ekzon 1, CYP21A2 Ekzon 3, CYP21A2 Ekzon 4
18	ERK	Geniş Delesyon	CYP21A2 Ekzon 1 ve CYP21A2 Ekzon 3
22	HS	Geniş Delesyon	C4A Ekzon 17, CYP21A2 Ekzon 1, CYP21A2 Ekzon 3
23	DA K	Geniş Delesyon	C4B Ekzon 19, CYP21A2 Ekzon 1, CYP21A2 Ekzon 3, CYP21A2 Ekzon 4, CYP21A2 Ekzon 6, CYP21A2 Ekzon 8
24	AK	Geniş Delesyon	C4B Ekzon 19, CYP21A2 Ekzon 1, CYP21A2 Ekzon 3, CYP21A2 Ekzon 4, CYP21A2 Ekzon 6 ve CYP21A2 Ekzon 8

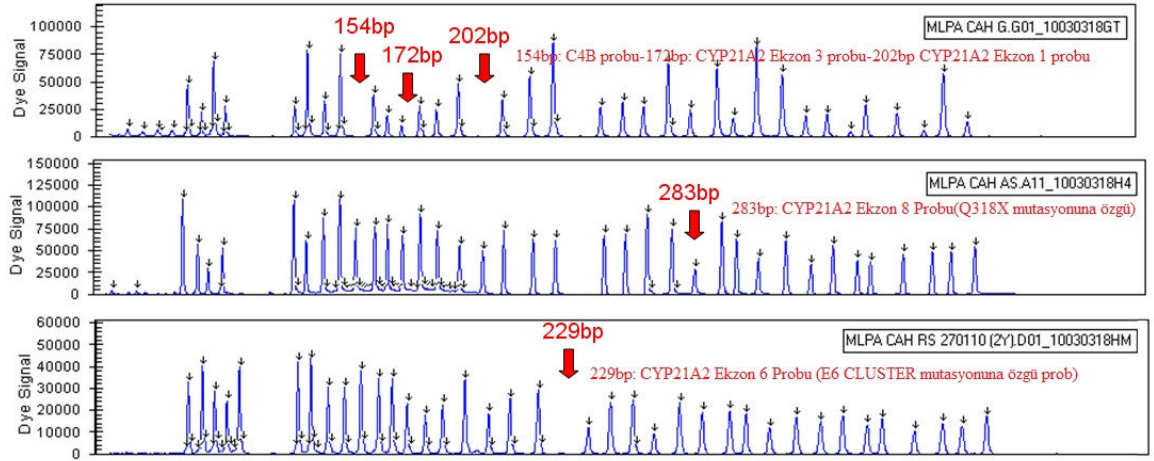
PCR ve RFLP yöntemleriyle homozigot I172N mutasyonu saptanan hastalardan GC, OT ile heterozigot I172N mutasyonu taşıyan hastalardan ZSK, IUS ve FA' nin MLPA pik analizi ve Coffalyser Prediction Sonucu CYP21A2 Ekzon 4' de delesyon göstermekteydi. CYP21A2 Ekzon 4 probu I172N mutasyonuna özgü probdu. MLPA sonuçları bu mutasyonların varlığını doğrulamaktaydı.

MLPA çalışmasıyla saptanabilen mutasyonlardan Q318X mutasyonu PCR ve RFLP yöntemleriyle homozigot taşıdığı saptanan hastalar OS, AS ve IS ile heterozigot taşıdığı saptanan hastalardan HY MLPA pik analizi ve Coffalyser Prediction Sonucu CYP21A2 Ekzon 8' de delesyon göstermekteydi. CYP21A2 Ekzon 8 Q318X mutasyonuna özgü probdu. MLPA sonuçları Q318X mutasyonunu doğrulamaktaydı.

PCR ve RFLP ile homozigot E6 Cluster mutasyonunun saptandığı tek hasta RS' nin MLPA pik analizi (Şekil 23-C) ve Coffalyser Prediction Sonucu CYP21A2 Ekzon 6' da delesyon göstermekteydi. CYP21A2 Ekzon 6 E6 CLUSTER mutasyonuna özgü probdu, MLPA RFLP sonucunu doğrulamaktaydı.

Tablo 26. RFLP yöntemiyle Q318X, I172N ya da E6 cluster mutasyonu saptanmış hastaların MLPA sonuçları

SIR A	İSİ M	PCR-RFLP	Mutasyon İlişkili Prob	MLPA Sonucu
04	GÇ	Homozigot I172N	211bp	RPR: 0,37
05	HB	Compound Het. Q318X/I172N	283bp/211bp	RPR: 1,08/0,55
06	ÖS	Homozigot Q318X	283bp	RPR: 0,1
07	ZŞK	Heterozigot I172N	211bp	RPR: 0,26
09	ÖT	Homozigot I172N	211bp	RPR: 0,04
10	AŞ	Homozigot Q318X	283bp	RPR: 0,48
13	HY	Heterozigot Q318X	283bp	RPR: 0,44
15	İUŞ	Heterozigot I172N	211bp	RPR: 0,25
16	MT K	Compound Het Q318X/P30L	283bp	RPR: 1,22
19	RS	Homozigot E6 Cl	229bp	RPR: 0,02
20	FA	Heterozigot I172N	211bp	RPR: 0,35
21	İŞ	Homozigot Q318X	283bp	RPR: 0,58



Şekil 23. MLPA kapiller elektroforezi örnek pik görüntüleri

(A-Geniş delesyon örneği B-Q318X mutasyonu örneği C-E6 Cluster mutasyonu örneği)

5.TARTIŞMA

Konjenital Adrenal Hiperplazi’de vakaların %90’ dan fazlasının sebebi 21-Hidroksilaz eksikliğidir. Hastalık steroid 21-Hidroksilaz geni olan CYP21’ deki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Mutasyonların %90’ından fazlası CYP21 ile psödogeni olan CYP21P arasındaki intergenik rekombinasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Bunların yaklaşık %20’si ise mayozdaki “unequal crossing over” neticesinde CYP21P’deki delesyonların CYP21’e aktarıldığı “gene conversion” olaya sonucunda hastalığa neden olmaktadır.

21-Hidroksilaz eksikliğine bağlı klasik KAH’ da mutasyonların sıklıklarının saptanması için farklı toplumlarda bir çok çalışma gerçekleştirilmiştir. 2005 yılında Dolzan ve ark. orta Avrupalı KAH hastalarında (Klasik ve Non Klasik) gerçekleştirdikleri çalışmada, PCR-SSP, PCR-SSO, Southern Blot ve dizi analizi yöntemleriyle CYP21 genotipleme yapılmış ve 348 hastanın 341’ inde (%98’inde) hastalığa neden olan mutasyonları saptamışlardır. Mutasyonlarda, %31.2 oranında nt656g (IVS2), %28.4 oranında delesyon, %14,5 oranında I172N, %3,7 oranında P30L , %3,4 oranında V281L, %2,6 oranında Q318X, %2,4 oranında R356W ve %0,3 oranında E6 Cluster mutasyonlarını göstermişlerdir. Bu mutasyonların tüm mutant allellerin %95.2’ sini kapsadığı ve geriye kalan allellerin nadir mutasyonlar, küçük konversiyonlar tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir (20).

1999 yılında Ohlsson ve ark., tarafından Danimarka’ da gerçekleştirilen çalışmada, 68 KAH tanılı (Klasik ve Non Klasik) hastanın dizi analizi yöntemiyle CYP21 genotipleme yapılmış 68 hastanın 67’ sinde (%98.5) hastalığa neden olan mutasyonlar saptanmıştır. Mutasyon saptanan allellerin **%36’ sinda delesyon** , %33,8’ inde nt656g (IVS2), %10,3’ ünde I172N, %8,8’ inde Q318X, %4,4’ ünde V281L, %2,2’ sinde P30L ve R356W, %1,5’ sinde A362V ve E6 Cluster mutasyonları raporlamışlardır (21).

2004 yılında Kharrat ve arkadaşlarının 51 Tunuslu Klasik KAH tanılı hastada PCR, RFLP ve dizi analizi yöntemleriyle gerçekleştirdikleri CYP21 genotiplemesinde hastaların 50’ sinde (%98) hastalığa neden olan mutasyon tanımlamışlardır. Bu mutasyonların **%35,3’ ü Q318X**, %19,6’ sı delesyon, %17,6’ sı nt656g (IVS2), %10,8’ u I172N, %2,9’ u R356W, %2’ si R483W, %1’ i W19X ve 2669insC mutasyonlarıdır.

%3,9 oranında kompleks alleller saptanırken, %5,9 allelde mutasyon saptanmadığı raporlanmıştır (22).

Ramazani ve ark. (2008) İran’da gerçekleştirilen çalışmada allel spesifik PCR kullanılarak 50 KAH hastasının CYP21 genotiplemesini yayınlamışlardır. Hastaların %80’inde mutasyon saptandığı belirtilmiş, **%28 oranında nt656g (IVS2)**, %13 oranında 8-bp delesyonu, , %9 oranında Q318X, %9 oranında I172N, %3 oranında V281L, %3 oranında E6 cluster, %5 oranında R356W ve %0 oranında ve P30L mutasyonları saptanmıştır (23).

2008 yılında Sadeghi ve ark.’ nın ülkemizde gerçekleştirdiği çalışmada, 100 Klasik KAH tanılı hastada PCR ve RFLP yöntemleriyle CYP21 genotiplemesi raporlanmıştır. Hastaların %78’ inde hastalığa neden olan mutasyonlar saptanmış olduğu raporlanmıştır. Çalışmada **%28,5 oranında nt656g (IVS2)**, %17 oranında delesyon, %11,5 oranında Q318X, %4 oranında I172N, %3,5 oranında V281L, %3,5 oranında R356W, %3 oranında 8-bp delesyonu, %2 oranında kompleks alleller ve %1 oranında E6 cluster ve P30L mutasyonlarını saptamışlardır (24).

Çalışmamızda da üstte sözü edilen çalışmalardaki mutasyonlardan E6 Cluster, V281L, Q318X, R356W, IVS2, I172N, P30L mutasyonları ve 8 baz ve daha geniş delesyonları incelenmiş ve 26 çocuk hasta popülasyonumuzda CYP21 geninde %96.1 (25/26) hastada mutasyon saptanmıştır. Hastaların 18’ inde (%69.3) homozigot, 3’ ünde (%11.6) “compound heterozigot” ve 4’ ünde (%15.4) heterozigot mutasyon saptanırken bir hastada (%3.7) incelenen mutasyonlardan herhangi biri saptanmamıştır.

26 hastanın incelenen 52 allelinin 46’ sında (%88.4) mutasyon saptanmıştır. Mutant allellerin içinde **en yüksek oranda (%23) geniş delesyon saptanmıştır**. Nokta mutasyonlarından %17,3 oranında Q318X , %15,3 oranında nt656g (IVS2), %15,3 oranında I172N, %7,7 oranında R356W, %3,8 oranında P30L, %3,8 oranında E6 cluster ve %1,9 oranında V281L mutasyonları saptanmıştır. 8-bp delesyonu saptanmamıştır.

Çalışmamızda elde edilen sonuçların literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırması Tablo 27’ de özetlenmiştir.

Çalışmamızda en sık saptanan 4 mutasyon olan geniş delesyonlar, Q318X, IVS2 ve I172N mutasyonları hastaların %85’ inde saptanmıştır. Ayrıca bu mutasyonlar saptanan tüm mutasyonların %80.6’ sını kapsamaktadır. Bölgemizde bundan sonra yürütülecek

benzer çalışmalarda öncelikle bu mutasyonların denetlenmesi hastalardaki genetik bozuklukların yüksek oranlarda saptanmasını sağlayabilecektir.

Çalışmamızda saptanan mutasyonların dağılımı literatürde raporlananlardan farklılıklar göstermektedir. Orta Avrupa, Danimarka' da, İran' da ve ülkemizde daha önce yapılmış olan 4 çalışmada (Tablo 27) IVS2 mutasyonu ve delesyonlar en sık değişikliklerken, Tunus' da gerçekleştirilen çalışmada Q318X mutasyonu ve delesyonlar en sık saptanmıştır. Çalışmamızda en sık saptanan iki değişiklik delesyonlar ve Q318X mutasyonudur. Çoğu toplumda en sık rastlanılan değişikliklerden olan delesyonların çalışmamızda da sık rastlanması, hastalığın etyopatogenezinde etnik faktörlerin etkisinin az da olsa bulunduğunu fakat daha çok benzer genetik mekanizmaların hastalığın geçişinde etkili olduğu fikrini desteklemektedir (20). Çalışmamızda 2. sıklıkta saptanan Q318X mutasyonun literatürdeki diğer serilerde tanımlanan %0,5-13,8 oranlarından yüksek saptanması (%17,3), çalışmamızın küçük bir hasta popülasyonunda ve Karadeniz gibi göreceli olarak izole bir bölgede gerçekleştirilmiş olmasına bağlı olduğu speküle edilebilir. Ayrıca Kharrat ve ark. Tunus' da gerçekleştirdikleri çalışmada %35,3 oranında saptamış oldukları yüksek Q318X mutasyon oranını kendi toplumlarındaki "founder effect" e bağlı olabileceğini speküle etmişlerdir.

Tablo 27. Çalışmamızda ve literatürdeki çeşitli çalışmalarda saptanan allel frekansları

	E6 C1	V281L	Q318X	R356W	IVS2	I172N	P30L	8bp/Lar ge Delesyo n	Diğer
Dolzan ve ark. Orta Avrupa 2005 (%100)	%0,3	%3,4	%2,6	%2,4	%31,2	%14,5	%3,7	%29,4	%12
Ohlsson ve ark. Danimarka 1999(%104,2)	%1,5	%4,4	%8,8	%2,2	%33,8	%10,3	%2,2	%36	%5
Kharrat ve ark. Tunus 2004 (%94,1)	%0	%0	%35,3	%2,9	%17,6	%10,8	%0	%19,6	%7,9
Ramezani v ark. İran 2008 (%70)	%3	%3	%9	%5	%28	%9	%0	%13/-	-
Sadeghi ve ark. Türkiye 2008 (%78)	%1	%4,5	%12,5	%4,5	%28,5	%4	%1,5	%21	-
Çalışmamız Türkiye 2010 (%88,4)	%3,8	%1,9	%17,3	%7,7	%15,3	%15,3	%3,84	%23	

21-Hidroksilaz eksikliğine bağlı klasik KAH' da mutasyonlar, kalan enzim aktivitesine göre alleller *Ağır (Tip-A)*, *Orta (Tip-B)* ve *Hafif (Tip-C)* genotipler şeklinde sınıflanabilmektedir. Genotipin bu sınıflandırmasıyla, fenotip de hastanın iki allelinin sahip olduğu mutasyon gruplarına göre **Tuz kaybettiiren tip** [*ağır/ağır (Tip-A/ Tip-A) genotip*], **Basit virilizan tip** [*ağır/orta (Tip-A / Tip-B)* ya da *orta/orta (Tip-A/ Tip-A) genotip*] ve **Non-klasik tip** [*ağır/hafif (Tip-A/ Tip-C)*, *orta/hafif (Tip-B/Tip-C)* ve *hafif/hafif (Tip-C/Tip-C) genotip*] öngörümü sağlanabilmektedir (3).

1997 yılında Jaaskelainen ve ark. nın Finlandiya' da gerçekleştirdikleri çalışmada mutasyon analizi gerçekleştirilebilen 78 hastada genotip fenotip ilişkisinin iyi bir şekilde kurabildiklerini raporlamışlardır. Çalışmada daha önceki çalışmalarda bazı

linik varyasyonların raporlandığı IVS2 mutasyonunun şiddetli mineralokortikoid yetersizliğine neden olduğu ve ağır fenotiple ilişkili olduğuna dikkat çekilmiştir (45).

Wedell ve ark. 1994 yılında İsveç’ de gerçekleştirdikleri çalışmada 127 hastanın CYP21 genotiplemesini ve klinik ilişkilendirmesini raporlamışlardır. Araştırmacılar farklı kombinasyonlardaki mutasyonların ortaya konulmasının ve klinikle ilişkilendirilmesinin, prenatal tedavi endikasyonunun koyulmasında ve henüz klinik bulgular çıkmadan postnatal hastalık prognozunun belirlenmesinde yardımcı olduğunu belirtmişlerdir (46).

Speiser ve ark. 1992’ de 88 ailede gerçekleştirdikleri çalışmada, yukarıda da sözü edildiği biçimde Tip-A, Tip-B ve Tip-C genotipik sınıflandırmanın uygulandığı mutasyon grupları ile hastalık şiddeti arasında iyi bir korelasyon olduğunu raporlamışlardır (47).

Tüm bu yapılan çalışmalarda genotip fenotip korelasyonun yaklaşık %80 oranında doğru öngörüm getirdiği belirlenmiştir. (3).

Çalışmamıza katılan hastalardan başvuru anında tuz kaybı bulguları olan 15 hastanın genotipleri değerlendirildiğinde, mutasyon saptanan 15 hastanın tümünde **Ağır ya da Tip-A** tipte mutasyonlar (Delesyonlar, E6 Cluster mutasyonları, Q318X, IVS2 ve R356W mutasyonları) saptandığı görülmektedir. Bunlardan 6’sı delesyon, 3’ü Homozigot Q318X mutasyonu, 1’i heterozigot Q318X, 2’ si R356W, 2’ si IVS2, 1’i E6 Cluster ve mutasyonlarıdır.

Geniş delesyon saptanan 6 hastada da Kuşkulu Genital Yapı ve tuz kaybı bulguları saptanmıştır.

Benzer biçimde **homozigot Q318X** mutasyonu saptanan 3 hasta da klinik tuz kaybettiren ağır tip ile uyumludur. Q318X mutasyonu ekzon 8’ de 318. pozisyonda prematür terminasyona neden olan *Nonsense* bir mutasyondur.

Heterozigot Q318X mutasyonu saptanan hastamız HY’ de kusma şikayetiyle başvuran bir hastadır ve dış genitalyasında hiperpigmentasyonu mevcuttur. Laboratuvar incelemesinde ağır forma uygun tuz kaybını gösteren hiponatremi ve hiperpotasemi saptanmıştır. Q318X in heterozigot formunun direkt ağır klinik ilişkisi literatür bilgilerine göre beklenen bir durum değildir. Ancak “compound heterozigozite” tanımlanmıştır. Bu nedenle de hastamızın heterozigot formda saptanan Q318X

mutasyonu dışında diğer allellinde, panelimizde mevcut 7 nokta mutasyonu ve 2 delesyon dışında, farklı bir allel değişikliği olduğu düşünülmektedir.

IVS2 mutasyonu saptanan 2 hastamız (AU ve HA), **R356W** mutasyonu saptanan 2 hastamızda (AO ve MYA) ve **E6 cluster** Mutasyonu saptanan tek hastamız RS kusma şikayetleriyle başvurmuşlar, laboratuvar değerlendirmeleri tümünde tuz kaybını ortaya koymuştur. Bu hastalarda saptanan IVS2, R356W ve E6 Cluster mutasyonlarının tümü literatürde tuz kaybettiren fenotip ile ilişkilendirilmiş mutasyonlardır (3,47).

Çalışmamızda, 26 vakanın, tuz kaybıyla seyreden 15 vakası dışındaki 11 olgumuz basit virilizan klinik seyir göstermektedir. Literatür verileri basit virilizan KAH 1 ağır/orta (*Tip-A / Tip-B*) ya da orta/orta (*Tip-A/ Tip-A*) genotiple birlikte tanımlamışlardır (3,47). Bu gruptaki hastalarımızda 2 tanesinde homozigot I172N, 3 tanesinde heterozigot I172N, 2 tanesinde homozigot IVS2 mutasyonları saptanmıştır. 3 hastada mutasyonlar “compound heterozigot” formda saptanmıştır. Bir hastamızda taranan mutasyonlardan herhangi biri saptanmamıştır.

Literatür verilerine göre **I172N** mutasyonu basit virilizan tipin bilinen en sık nedenidir. Mutasyonu homozigot formda taşıyan hastalar, normal enzim aktivisinin yaklaşık %1 ine sahiptirler. I172N alleli saptanan 6 hastamızdan 2’si (GC ve OT) nde homozigot, 3’ü (ZSK, IUS ve FA) nde heterozigot ve birinde (HB) I172N ve Q318X mutasyonu birlikte olmak üzere “compound heterozigot” form bulunmaktadır.

I172N mutasyonu için heterozigozite saptanmış olduğumuz 3 olguyu yalnız bu genotiple basit virilizan KAH kliniği ile bağdaştırmak güçtür. Zira bu olguların resesif bir kalıtım modeli olan KAH da asemptomatik olmaları beklenmektedir. Bu nedenle klinik bulguları belirgin olan vakalarımızda panelimizde olmayan bir başka orta (Tip-B) ya da ağır (Tip-A) genotipinin olabileceği ve bu hastaların “compund” heterozigozite göstermiş olabilecekleri öne sürülebilmektedir. Bu temelde dizi analizi çözümleyici olacaktır.

Basit virilizan tip fenotip uyumlu bir diğer mutasyon homozigot IVS2 dir. Homozigot IVS2 mutasyonu CYP21 intron 2 “splice site” ini etkileyerek prekürsör mRNA’ dan matür mRNA oluşumu sırasında normalde atılması gereken 19 bazın matür mRNA’ da kalmasına ve okunma çerçevesinin kaymasına neden olmaktadır. Bu şekilde enzimin neredeyse tamamı anormal yapıdadır. İlginç olarak kültüre edilmiş hücrelerde çok az (%1) normal enzim aktivitesi saptanabilmektedir. Bu nedenle IVS2 mutasyon

hem tuz kaybettiren hem basit virilizan tip klinikle ilişkilidir. Çalışmamızda homozigot IVS2 mutasyonu saptanan 4 hastanın (AU, HA, OAT ve BC) 2'si tuz kaybettiren fenotip gösterirken diğer 2'si (OAT ve BC) basit virilizan klinik göstermektedir. Bu durum mutasyonun tanımlanan doğasına uygundur.

Yukarıda da sözü edildiği biçimde Q318X homozigot genotipi, enzim aktivitesinde tam kayba yol açan ağır klinik ilişkili bir mutasyon olarak sınıflanmaktadır. Ancak Kharrat ve ark. yaptıkları çalışmada, Q318X mutasyonunun I172N, ve P30L mutasyonları ile “compound heterozigot” oldukları durumlarda, hastaların basit virilizan kliniğe sahip olabilecekleri tartışılmıştır. Q318X/I172N Compound Heterozigot genotipine sahip hastamız da bu görüşü doğrular biçimde basit virilizan fenotipe sahip olan bir hastadır.

Q318X için Compound Heterozigot olan (Q318X/ P30L) diğer hastamız (MTK) yenidoğan döneminde emmeme ve genital hiperpigmentasyon nedenleriyle değerlendirilmiş olan ve tetkiklerinde hafif 17-hidroksiprogesteron ve ACTH artışları saptanmış olgumuzdur. Hastamız bir süre medikal tedavi aldıktan sonra takipten çıkarılmıştır. Fenotip ve prognoz olarak basit virilizan klinik ile uyumludur.

Speiser ve ark. çalışmalarında, V281L ve P30L mutasyonlarının her ikisini hafif klinik ile (basit virilizan veya non-klasik form) ilişkilendirmişlerdir (3,47). Çalışmamızda da bir hastamızda saptanan “Compound” Heterozigot form V281L/ P30L mutasyonu hiperpigmente dış genital yapı ve hafif yüksek 17-hidroksiprogesteron ve ACTH artışı ile birlikte izlenmiştir. Bu hastamız bir süre medikal tedavi aldıktan sonra takipten çıkarılmıştır.

Okten ve ark. 2009 yılında raporladıkları çalışmalarında “distal phalanges” agenezisi saptadıkları hastalarında homozigot P30L mutasyonu varlığını tartışmışlardır.

Sonuç olarak çalışmamıza katılan tuz kaybettiren fenotipe sahip tüm hastaların *ağır (Tip-A)/ağır (tip-A)* genotipe sahip oldukları, basit virilizan fenotipe sahip tüm hastaların *ağır/orta (Tip-A / Tip-B)* ya da *orta/orta (Tip-A/ Tip-A)* genotipe sahip oldukları saptanmıştır. Klasik KAH olarak değerlendirilip çalışmaya dahil edilen 2 hastamızda *ağır/hafif (Tip-A / Tip-C)* ve *hafif/hafif (Tip-C/ Tip-C)* genotipler saptanmıştır. Bu genotiplerle Non-klasik fenotipe uyması beklenen hastaların, çok hafif bulgularla klasik hastalık grubuna dahil edilmiş oldukları ve bu hastaların bir süre

medikal tedavi aldıktan sonra takiplerinin kesildiği saptanmıştır. Çalışmamıza katılan hasta grubunda mutasyon saptanabilen hastalarda genotip-fenotip ilişkisi tam kurulabilmiştir.

PCR-RFLP ve MLPA Yöntemlerinin Etkinliklerinin Karşılaştırılması

Çalışmamıza katılan 26 hastanın CYP21 genotiplerinin belirlenmesi için PCR, PCR-RFLP ve MLPA yöntemleri kullanılmıştır. İncelenen allellerin %88,4'ünde mutasyon saptanmıştır.

Delesyonların çalışılması için literatürde sıklıkla Southern Blot ve PCR yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmamızda her vaka için 8-bp deleyonunu ve geniş delesyonları saptamak amacıyla 2 farklı PCR gerçekleştirilmişti ve 26 hastanın 6'ında (%23) homozigot geniş delesyon saptanmıştı. PCR yöntemi delesyonun genişliğinin belirlenmesinde yetersiz kalabilmektedir ve duplikasyonları da sıklıkla saptayamamaktadır. Ayrıca PCR reaksiyonunda yalancı pozitifliğe yol açabilecek etkenler 8-bp delesyonu ve geniş delesyon ayırımında yanlış karara neden olabilmektedir.

MLPA yöntemi delesyon duplikasyon gibi gen dozaj anomalileri saptayabilen yeni bir yöntem olarak tanımlanmıştır.

Literatürde KAH tanısı için kullanılan diğer yöntemleri MLPA ile karşılaştıran sadece bir çalışma mevcuttur. Concolino ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınladıkları bu çalışmada daha önce Southern Blot ve dizi analizi yöntemleriyle saptadıkları 7 delesyon ve 2 duplikasyonun tümünün MLPA yöntemiyle onaylandığını raporlamışlardır. Araştırmacılar MLPA yönteminin KAH moleküler tanısında oldukça bilgi verici bir yöntem olabileceğini tartışmış, fakat bilinen en polimorfik genlerden biri olan CYP21A2 geninin kompleks yapısı nedeniyle bu çalışmaların CYP21A2 genetiği hakkında derin tecrübe gerektirdiğini vurgulamışlardır. Çalışmada sonuç olarak MLPA'nın CYP21A2/CYP21A1P delesyon/duplikasyonlarını tanımada basit, hızlı ve hassas bir yöntem olarak tanımlanmıştır (25).

Çalışmamızda, PCR yöntemiyle delesyon saptanan 6 vakanın tümünde MLPA yöntemi delesyonlar onaylamıştır. PCR' da delesyonlar saptanmakla birlikte ilgili

lokusların tanımlanması mümkün değildir. MLPA ile delesyon saptanan hastaların delesyona uğramış bölgelerin tanımlanması mümkün olmuştur (Tablo 25).

Ülkemizde 21-Hidroksilaz eksikliğine bağlı Klasik KAH vakalarının değerlendirildiği Sadeghi ve arkadaşlarının çalışması ve bizim çalışmamızda sıklık açısından sırasıyla ikinci ve birinci sırada saptanan geniş delesyonların tanısı için MLPA yöntemi önemli bir seçenek olarak değerlendirilmelidir (24).

Çalışmamızda kullanılan MRC Hollanda firmasının KAH MLPA kitinde delesyon ve duplikasyonların tanınması dışında sık karşılaşılan 4 mutasyona yönelik dizayn edilmiş 4 prob mevcuttur. Problar ekzon 3, 4, 6 ve 8' e de sırasıyla saptanabilen **8-bp delesyonu, I172N, E6 cluster ve Q318X** mutasyonlarının “Wild Type” larına göre dizaynedildiğinden bu mutasyonların varlığında ilgili problemler için delesyon/kayıp gösterebilmektedir. Çalışmamızda PCR-RFLP yöntemleriyle taranan 7 nokta mutasyonundan 3'ü olan **I172N, E6 Cluster ve Q318X** mutasyonları ve PCR ile incelenmiş **8-bp delesyonu** MLPA kitinin ilgili özgün problemleriyle de değerlendirilmiştir. Problemler nokta mutasyonların varlığında da hedef DNA dizisine hibridize olamamaktadır bu durumda MLPA analizinde Relative Peak Ratio (RPR)' de azalma beklenmektedir. Çalışmamızda **I172N, E6 cluster ve Q318X** mutasyonlarından en az birini taşıyan 12 hastamızdan 10' unda MLPA analizinde mutasyon varlığını destekleyen 0,7' den düşük RPR değerleri saptanmıştır. 2 hastada RPR değeri düşük değildir, bu hastaların RFLP' de ilgili problemlerin mutasyonları için “compound heterozigot” formda bulunması MLPA' da RPR'lerinin düşük saptanmamasını açıklayabilmektedir.

MRC-Holland firması tarafından üretilen P050-B2 KAH MLPA analiz kitinin esasen delesyon ve duplikasyonların tanınması için dizaynedildiği vurgulanmaktadır. Ligasyon bölgesinde olmasa bile hedef bölgedeki nokta mutasyonları ve polimorfizmler, ayrıca hedef DNA'nın saflığı ve optimize edilemeyen koşullar uygulandığında hedef DNA'ya bağlanmasında değişikliklere neden olabildiği bilinmektedir. Bu değişiklikler, kimi zaman referans problemlerde bile RPR' lerde düşüşe ve delesyon yorumuna neden olabilmektedir.

Çalışmamızda 26 hastanın 3'ünde referans problemlerde delesyon saptanmıştır. Ayrıca 4 hastada PCR-RFLP sonuçlarıyla uyumsuz olarak 178-bp probunda delesyon saptanmıştır. Referans problemlerde saptanan ? delesyon ön çalışma temelinde

gerçekleştirdiğimiz MLPA çalışmamızın optimize edilememesine bağlı olabilir. 178-bp için ise üretici firmanın son dönemde yayınladığı bilgilerde 178-bp probunun daha az güvenilir olduğu ve 154-bp, 160-bp, 364-bp ve 382-bp problemlerinin değişken oldukları raporlanmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda MLPA analizi, PCR ve RFLP ile saptanan delesyonların tamamını saptamıştır. PCR ve RFLP nokta mutasyonları panelimizde bulunan ve MLPA ile saptanabilen mutasyonlar olan E6 Cluster , I172N ve Q318X mutasyonlarının %83' ü MLPA yöntemi ile onaylamıştır.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda 21-Hidroksilaz eksikliğine bağlı klasik konjenital adrenal hiperplazi tanılı 26 hastada PCR-RFLP ve MLPA teknikleriyle saptanan CYP21 geninin mutasyonları derlenmiş, saptanmış olan mutasyonların dağılımının ortaya konulması, hastalıkla ilgili genotip fenotip ilişkisi kurulması ve bu iki tekniğin etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Yapılan çalışmanın sonucunda;

1. Hasta popülasyonunun % 96,19' unda mutasyon saptanmıştır.
2. Değerlendirilen 52 allelden 46'sında (%88,4) mutasyon saptanmıştır. En sık olarak %23 oranında geniş delesyon saptanmıştır. Nokta mutasyonlarından %17,3 oranında Q318X, %15,3 oranında nt656g (IVS2), %15,3 oranında I172N, %7,7 oranında R356W, %3,8 oranında P30L, %3,8 oranında E6 cluster ve %1,7 oranında V281L mutasyonları saptanmıştır.
3. Çalışmamızda en sık saptanan 4 mutasyon (geniş delesyonlar, Q318X, IVS2 ve I172N) hastaların %85' ini tanımlamaktadır.
4. Çalışmaya katılan hastalardan klinik temelde hastalık bulguları allelik mutasyonların kategorize edildiği alt gruplarla uyumludur (Tablo 2). Tuz kaybettiren fenotipe sahip tüm hastaların *ağır/ ağır* genotipe sahip oldukları, basit virilizan fenotipe sahip tüm hastaların *ağır/orta* ya da *orta/orta genotipe sahip oldukları* ve hafif fenotipe sahip tüm hastaların *ağır/hafif* ve *hafif/hafif* genotipe sahip oldukları saptanmıştır. Çalışmamıza katılan hasta grubunda mutasyon saptanabilen hastaların tümünde tam bir genotip-fenotip ilişkisi kurulabilmiştir.
5. Mutasyonların saptanmasında kullanılan 2 yöntemden MLPA analizi, PCR-RFLP ile saptanan delesyonların tamamını, MLPA ile saptanabilir nokta mutasyonlarının %83' ünü onaylamıştır.
6. KAH hastalığının ülkemizdeki mutasyon dağılımının daha net ortaya koyulabilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. REFERANSLAR

1. Eugster, Pescovitz. **Developmental endocrinology: from research to clinical practice**, Contemporary endocrinology Humana Press, 2002
2. Susan Tucker Blackburn. **Maternal, fetal, & neonatal physiology: a clinical perspective**, Elsevier Health Sciences, 2007
3. White PC, Speiser PW. **Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency**. Endocr Rev. 2000 Jun;21(3):245-91.
4. James Emmett Griffin, Sergio R. Ojeda. **Textbook of endocrine physiology** Oxford University Press US, 2004
5. Leonard Pinsky, Robert P. Erickson, R. Neil Schimke. **Genetic disorders of human sexual development** Oxford University Press US, 1999
6. David A. Warrell. **Oxford textbook of medicine: Sections 18-33, Cilt 3, Normal and abnormal sexual differentiation** Oxford University Press US, 2005
7. Lahiri. Clinical Genetics, Chapter 9, Shah, Sujit, **An approach to ambiguous genitalia**, Jaypee Brothers Publishers. 2005
8. Patricia E. Molina **Endocrine physiology**, McGraw-Hill Professional, 2003
9. Guyton-Hall, **Textbook of medical physiology**, W.B. Saunders, 1996
10. Francis Sorrel Greenspan, David G. Gardner **Basic and clinical endocrinology** Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2007

11. David L. Rimoin, J. Michael Connor, Alan E. H. Emery, Reed E. Pyeritz **Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics**, Cilt 1, Elsevier Health Sciences, 2007
12. István Raskó, C. S. Downes **Genes in medicine: molecular biology and human genetic disorders**, Springer, 1995
13. Norman Lavin **Manual of Endocrinology and Metabolism** Lippincott Williams & Wilkins, 2009
14. Fima Lifshitz **Pediatric Endocrinology Volume 2: Disorders of sexual development**, CRC Pres, 2006
15. J. Larry Jameson **Principles of molecular medicine**, Humana Press, 1998
16. OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
17. Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
18. Aubrey Milunsky, Jeff Milunsky **Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment**, Wiley, 2010
19. Torresani T, Biason-Lauber A. **Congenital adrenal hyperplasia: diagnostic advances**. J Inherit Metab Dis. 2007 Aug;30(4):563-75.
20. Dolzan V, Sólyom J, Fekete G, Kovács J, Rakosnikova V, Votava F, Lebl J, Pribilincova Z, Baumgartner-Parzer SM, Riedl S, Waldhauser F, Frisch H, Stopar-Obreza M, Krzysnik C, Battelino T. **Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia**. Eur J Endocrinol. 2005 Jul;153(1):99-106.

21. Ohlsson G, Müller J, Skakkebaek NE, Schwartz M. **Steroid 21-hydroxylase deficiency: mutational spectrum in Denmark, three novel mutations, and in vitro expression analysis.** Hum Mutat. 1999;13(6):482-6
22. Kharrat M, Tardy V, M'Rad R, Maazoul F, Jemaa LB, Refaï M, Morel Y, Chaabouni H. **Molecular genetic analysis of Tunisian patients with a classic form of 21-hydroxylase deficiency: identification of four novel mutations and high prevalence of Q318X mutation.** J Clin Endocrinol Metab. 2004 Jan;89(1):368-74.
23. Ramazani A, Kahrizi K, Razaghiazar M, Mahdih N, Koppens P. **The frequency of eight common point mutations in CYP21 gene in Iranian patients with congenital adrenal hyperplasia.** Iran Biomed J. 2008 Jan;12(1):49-53.
24. Sadeghi F, Yurur-Kutlay N, Berberoglu M, Cetinkaya E, Aycan Z, Kara C, Ilgin Ruhi H, Ocal G, Siklar Z, Elhan A, Tukun A. **Identification of frequency and distribution of the nine most frequent mutations among patients with 21-hydroxylase deficiency in Turkey.** J Pediatr Endocrinol Metab. 2008 Aug;21(8):781-7.
25. Concolino P, Mello E, Toscano V, Ameglio F, Zuppi C, Capoluongo E. **Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for the detection of CYP21A2 gene deletions/duplications in congenital adrenal hyperplasia: first technical report.** Clin Chim Acta. 2009 Apr;402(1-2):164-70.
26. Kelestimur F, Everest H, Dundar M, Tanriverdi F, White C, Witchel SF. **The frequency of CYP 21 gene mutations in Turkish women with hyperandrogenism.** Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2009 May;117(5):205-8. Epub 2008 Oct 1.

27. Loidi L, Quinteiro C, Parajes S, Barreiro J, Lestón DG, Cabezas-Agrícola JM, Sueiro AM, Araujo-Vilar D, Catro-Feijóo L, Costas J, Pombo M, Domínguez F. **High variability in CYP21A2 mutated alleles in Spanish 21-hydroxylase deficiency patients, six novel mutations and a founder effect.** Clin Endocrinol (Oxf). 2006 Mar;64(3):330-6.
28. Delague V, Souraty N, Khallouf E, Tardy V, Chouery E, Halaby G, Loiselet J, Morel Y, Mégarbané A. **Mutational analysis in Lebanese patients with congenital adrenal hyperplasia due to a deficit in 21-hydroxylase.** Horm Res. 2000;53(2):77-82.
29. Deneux C, Tardy V, Dib A, Mornet E, Billaud L, Charron D, Morel Y, Kuttann F. **Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.** J Clin Endocrinol Metab. 2001 Jan;86(1):207-13.
30. Grischuk Y, Rubtsov P, Riepe FG, Grötzinger J, Beljelarskaia S, Prassolov V, Kalintchenko N, Semitcheva T, Peterkova V, Tiulpakov A, Sippell WG, Krone N. **Four novel missense mutations in the CYP21A2 gene detected in Russian patients suffering from the classical form of congenital adrenal hyperplasia: identification, functional characterization, and structural analysis.** J Clin Endocrinol Metab. 2006 Dec;91(12):4976-80. Epub 2006 Sep 19.
31. Goossens K, Juniarto AZ, Timmerman MA, Faradz SM, Wolffenbuttel KP, Drop SL, de Jong FH. **Lack of correlation between phenotype and genotype in untreated 21-hydroxylase-deficient Indonesian patients.** Clin Endocrinol (Oxf). 2009 Nov;71(5):628-35. Epub 2009 Feb 18.
32. Day DJ, Speiser PW, Schulze E, Bettendorf M, Fitness J, Barany F, White PC. **Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal**

- hyperplasia (CAH) affected pedigrees.** Hum Mol Genet. 1996 Dec;5(12):2039-48.
33. Mao R, Nelson L, Kates R, Miller CE, Donaldson DL, Tang W, Ward K. **Prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency caused by gene conversion and rearrangements: pitfalls and molecular diagnostic solutions.** Prenat Diagn. 2002 Dec;22(13):1171-6.
 34. L'Allemand D, Tardy V, Grüters A, Schnabel D, Krude H, Morel Y. **How a patient homozygous for a 30-kb deletion of the C4-CYP 21 genomic region can have a nonclassic form of 21-hydroxylase deficiency.** J Clin Endocrinol Metab. 2000 Dec;85(12):4562-7.
 35. Neocleous V, Ioannou YS, Bartsota M, Costi C, Skordis N, Phylactou LA. **Rare mutations in the CYP21A2 gene detected in congenital adrenal hyperplasia.** Clin Biochem. 2009 Sep;42(13-14):1363-7. Epub 2009 Jun 6.
 36. de-Araujo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra G Jr, Farah SB, de-Mello MP. **Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency.** Braz J Med Biol Res. 1996 Jan;29(1):1-13.
 37. Nimkarn S **Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia.**, New MI. Horm Res. 2007;67(2):53-60
 38. Gonçalves J, Friães A, Moura L **Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency.** Expert Rev Mol Med. 2007 Apr 30;9(11):1-23. Review.
 39. J. I. Mason **Genetics of steroid biosynthesis and function**, CRC press, 2002

40. Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI 1995 Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2322–2329
41. Margaret W. Thompson, Robert L. Nussbaum, Roderick R. McInnes, Huntington F. Willard, James S. Thompson, Cornelius F. Boerkoel III **Genetics in medicine:** Thompson & Thompson Elsevier, 2004
42. Okten G, Pinarli FA, Kara C, Tukun A, Kara N, Gunes SO Congenital adrenal hyperplasia associated with agenesis of the finger and toe distal phalanges, *Paediatrica Croatica* 2009, Supp(2), 72
43. Jack J. Pasternak **An introduction to human molecular genetics: mechanisms of inherited diseases**, Wiley, 2005
44. Coffalyser
45. Jääskeläinen J, Levo A, Voutilainen R, Partanen J. **Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency: good correlation in a well defined population.** *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Oct;82(10):3293-7.
46. Wedell A, Thilén A, Ritzén EM, Stengler B, Luthman H. **Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation.** *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 May;78(5):1145-52.
47. P W Speiser, J Dupont, D Zhu, J Serrat, M Buegeleisen, M T Tusie-Luna, M Lesser, M I New, P C White **Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.***J Clin Invest.* 1992; 90(2):584 doi:10.1172/JCI115897