

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**PREMATÜR OVER YETERSİZLİĞİ OLAN HASTALARDA  
*BMP15* VE *FOXL2* GENİ MUTASYON ANALİZİ**

**Dr. Mehmet Burak MUTLU**

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç. Dr. Halil Gürhan KARABULUT**

**ANKARA**

**2014**



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**PREMATÜR OVER YETERSİZLİĞİ OLAN HASTALARDA  
*BMP15* VE *FOXL2* GENİ MUTASYON ANALİZİ**

**Dr. Mehmet Burak MUTLU**

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç. Dr. Halil Gürhan KARABULUT**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü BAP Koordinasyon Birimi  
Koordinatörlüğü tarafından, 13L3330013 kod numarasıyla desteklenmiştir.**

**ANKARA  
2014**





**ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**TEZ SINAVI TUTANAĞI**

| I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN                             |                              |
|------------------------------------------------------|------------------------------|
| Adı, Soyadı : Dr. M. Burak Mutlu                     | Tarih:<br><br>29 / 12 / 2014 |
| Anabilim/Bilim Dalı : Tıbbi Genetik AD               |                              |
| Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Halil Gürhan KARABULUT |                              |

| II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER                                                                                  |                                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tezin Başlığı: Prematür over yetersizliği olan hastalarda <i>BMP15</i> ve <i>FOXL2</i> geni mutasyon analizi |                                                                                                          |
| Tezin Niteliği:                                                                                              | <input checked="" type="checkbox"/> Ana Dal Uzmanlık Tezi <input type="checkbox"/> Yan Dal Uzmanlık Tezi |
| Kaçıncı tez sınavı olduğu:                                                                                   | <input type="checkbox"/> 1 <input checked="" type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3              |

| III. KARAR                                                                          |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Kabulüne                                        |  |
| <input type="checkbox"/> Reddine                                                    |  |
| <input type="checkbox"/> Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine   |  |
| oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.                                      |  |

| IV. AÇIKLAMALAR |  |
|-----------------|--|
|                 |  |

**Jüri Başkanı**

Unvanı, Adı, Soyadı  
Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ

A.Ü.T.F. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**Jüri Üyesi**

Unvanı, Adı, Soyadı  
Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN  
Gazi Ü.T.F. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**Jüri Üyesi**

Unvanı, Adı, Soyadı  
Yrd. Doç. Dr. Halil Gürhan KARABULUT  
A.Ü.T.F. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

## ÖNSÖZ

Prematür over yetersizliği (POY) 40 yaşından önce ovaryan fonksiyonların durması (düzenli menstrüel siklusların 4-6 aydan uzun süre kesilmesi) nedeni ile oluşan amenore durumu olarak tanımlanmaktadır. Etyolojisinde genetik faktörler rol oynamaktadır. *BMP15* ve *FOXL2* genleri bunların en önemlileri arasında yer almaktadır. POY'lu hastalarda yapılan çalışmalarda *BMP15* geni mutasyon sıklığının yüksek olduğu gösterilmiştir. *BMP15* ve *FOXL2* geni aynı zamanda folikül gelişiminde rol oynayan önemli faktörlerdendir. Bu nedenle POY tanılı hastalarda *BMP15* ve *FOXL2* gen değişikliklerinin analizi bu teze konu olmuştur.

Tıbbi genetik uzmanlığımı Türkiye'nin en iyi tıbbi genetik bölümlerinden biri olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda tamamlamış olmaktan büyük kıvanç duymaktayım. Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Hatice Ilgın Ruhi başta olmak üzere çok kıymetli hocalarım, Prof. Dr. Ajlan Tükün, Yrd. Doç. Dr. Halil Gürhan Karabulut, Yrd. Doç. Dr. Timur Tuncalı, Yrd. Doç. Dr. Nüket Yürür Kutlay'a bilimsel ve mesleki gelişimime kıymetli katkılarından ve emeklerinden ötürü sonsuz şükranlarımı sunarım.

Kıymetli hocam tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Halil Gürhan Karabulut'a, tezimin konusunun belirlenmesinden, laboratuvardaki en ufak probleme kadar birçok zorlukta bilimsel yaklaşımı ve tecrübesiyle bana yol gösterdiğinden ve katkılarını esirgemediğinden ötürü şükranım.

Çok kıymetli katkılarından ve paylaşımlarından dolayı başta Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Sağlığı ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Cem Atabekoğlu ve Uzm. Dr. Esra Çetinkaya'ya, Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden Prof. Dr. Yaprak Üstün'e, ayrıca Uz. Dr. Vehap Topçu ve Uzm. Dr. Abdullatif Bakır'a, çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Arzu Vicdan, Dr. Sadiye Ekinci, Dr. Şule Biçer ve Dr. Özlem Türedi'ye, bana her konuda destek olan Moleküler Genetik Laboratuvar ekibimize ve bölümümüzün tüm çalışanlarına,

Emekleri ve fedakarlıklarını esirgemeyen canım anneme-babama ve kardeşime,

Her zaman yanımda ve bana destek olan, hayatımı güzelleştiren ve anlam katan sevgili eşim Şirin'e ve biricik oğlumuz Tarık'a,

Saygı ve sevgi dolu içten teşekkürlerimi sunarım.

Ankara - 2014

Dr. M. Burak Mutlu

## İÇİNDEKİLER

|                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Önsöz</b>                                                   | <b>i</b>  |
| <b>İçindekiler</b>                                             | <b>ii</b> |
| <b>Simgeler ve Kısaltmalar Dizini</b>                          | <b>x</b>  |
| <b>Şekiller Dizini</b>                                         | <b>ix</b> |
| <b>Tablolar Dizini</b>                                         | <b>xi</b> |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                | <b>1</b>  |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                       | <b>3</b>  |
| 2.1. Oogeneze ve Folikülogenez                                 | 3         |
| 2.1.1. Primordial Germ Hücre ve Folikül Formasyonu             | 3         |
| 2.1.2. Primordial Folikül Oluşumu                              | 6         |
| 2.1.3. Primordial Folikül Aktivasyonu ve Primer Foliküle Geçiş | 6         |
| 2.1.4. Primer Folikülden Sekonder Foliküle Geçiş               | 9         |
| 2.1.5. Preantral ve Antral Dönem                               | 9         |
| 2.2. Menopoz ve Fizyolojisi                                    | 11        |
| 2.3. Genetik Nedenler                                          | 12        |
| 2.3.1. X Kromozomu Defektleri                                  | 13        |
| 2.3.2. X Kromozomu Üzerinde Bulunan POY Genleri                | 14        |
| 2.3.2.1. <i>FMRI</i> Geni                                      | 14        |
| 2.3.2.2. <i>FMR2</i> Geni                                      | 15        |
| 2.3.2.3. <i>POF1B</i> Geni                                     | 15        |
| 2.3.3. Otozomal Kromozomlarda Bulunan POY Genleri              | 16        |
| 2.3.3.1. <i>NOBOX</i> Geni                                     | 16        |
| 2.3.3.2. <i>FIGLα</i> Geni                                     | 17        |
| 2.3.3.3. <i>NR5A1 (SF1)</i> Geni                               | 17        |
| 2.3.3.4. <i>STAG3</i> Geni                                     | 17        |
| 2.3.3.5. <i>HFMI</i> Geni                                      | 17        |
| 2.3.3.6. <i>FSH Reseptör (FSHR)</i> Geni                       | 18        |
| 2.3.3.7. <i>LH Reseptör (LHR)</i> Geni                         | 18        |
| 2.3.3.8. <i>FSH Beta (FSHβ)</i> Geni                           | 18        |
| 2.3.3.9. <i>LH Beta (LHβ)</i> Geni                             | 19        |

|                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.3.10. <i>Inhibin Alfa (INH<math>\alpha</math>)</i> Geni | 19        |
| 2.3.3.11. <i>POLG</i> Geni                                  | 19        |
| 2.3.3.12. <i>EIF2B</i> Geni                                 | 20        |
| 2.3.3.13. <i>NOG (NOGGIN)</i> Geni                          | 20        |
| 2.3.3.14. <i>GDF9</i> Geni                                  | 20        |
| 2.3.3.15. <i>TGFBR3</i> Geni                                | 21        |
| 2.3.3.16. <i>NANOS3</i> Geni                                | 21        |
| 2.3.3.17. <i>FOXO1</i> ve <i>FOXO3</i> Genleri              | 21        |
| 2.3.3.18. <i>ESR1</i> Geni                                  | 21        |
| 2.3.3.19. <i>CDKN1B</i> Geni                                | 21        |
| 2.3.3.20. <i>CITED2</i> Geni                                | 22        |
| 2.3.3.21. <i>DMC1</i> ve <i>MSH5</i> Genleri                | 22        |
| 2.4. Metabolik Anormallikler ve POY                         | 24        |
| 2.5. Otoimmünite                                            | 26        |
| 2.6. POY'un Diğer Nedenleri                                 | 26        |
| 2.7. POY Hastalarına Yaklaşım ve Tedavi                     | 27        |
| 2.8. <i>FOXL2</i> Geni                                      | 29        |
| 2.8.1. <i>FOXL2</i> ve Cinsiyet Gelişimi                    | 30        |
| 2.8.2. <i>FOXL2</i> 'nin Folikülogenezdeki Rolü             | 32        |
| 2.8.3. <i>FOXL2</i> Ekspresyonunun Regülasyonu              | 35        |
| 2.9. <i>BMP15</i> Geni ( <i>GDF9B</i> )                     | 36        |
| 2.9.1. <i>BMP15</i> ve Sinyal İletimi                       | 37        |
| 2.9.2. <i>BMP15</i> ve Fonksiyonları                        | 38        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                   | <b>40</b> |
| 3.1. Çalışma Grubu                                          | 40        |
| 3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri                    | 40        |
| 3.1.2. Dışlama Kriterleri                                   | 40        |
| 3.2. Yöntem                                                 | 40        |
| 3.2.1. Periferik Kandan Lenfosit Hücre Kültürü              | 40        |
| 3.2.2. DNA İzolasyonu                                       | 42        |
| 3.2.3. Fragman Analizi                                      | 42        |

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.4. AgaroZ Jel Elektroforezi                                  | 43        |
| 3.2.5. Örneklerin Kapillere Yükl enmesi                          | 44        |
| 3.2.6. Analiz                                                    | 44        |
| 3.2.7. Dizi Analizi                                              | 44        |
| <b>4. BULGULAR</b>                                               | <b>49</b> |
| 4.1. Kromozom Analizi                                            | 52        |
| 4.2. Fragman Analizi                                             | 52        |
| 4.3. Dizi Analizi                                                | 53        |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                               | <b>59</b> |
| <b>6. SONUÇLAR</b>                                               | <b>64</b> |
| <b>ÖZET</b>                                                      | <b>65</b> |
| <b>SUMMARY</b>                                                   | <b>66</b> |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                 | <b>67</b> |
| <br>                                                             |           |
| <b>EKLER</b>                                                     |           |
| <b>Ek 1. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Kararı</b> | <b>89</b> |
| <b>Ek 2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu</b>                 | <b>91</b> |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                        |                                                                                     |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ACOG</b>            | : American Congress of Obstetricians and Gynecologists                              |
| <b>AIRE</b>            | : Autoimmune regülator                                                              |
| <b>AMH</b>             | : Antimüllerian hormon                                                              |
| <b>ark</b>             | : Arkadaşları                                                                       |
| <b>APECED</b>          | : Otoimmün poliendokrinopati kandidiazis ektodermal distrofi sendromu               |
| <b>ASRM</b>            | : American Society for Reproductive Medicine                                        |
| <b>BAX</b>             | : BCL2-associated X protein                                                         |
| <b>BCL2</b>            | : B-cell CLL/lymphoma 2                                                             |
| <b>BCLX</b>            | : BCL2-like 1                                                                       |
| <b>BMP15</b>           | : Bone morphogenetic protein 15                                                     |
| <b>BPES</b>            | : Blepharophimosis ptosis epicanthus inversus sendromu                              |
| <b>bç</b>              | : Baz çifti                                                                         |
| <b>°C</b>              | : Santigrat derece                                                                  |
| <b>CBX2</b>            | : Chromobox homolog 2                                                               |
| <b>CDKN1B</b>          | : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B                                              |
| <b>CITED2</b>          | : Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2 |
| <b>CYP17A1</b>         | : Cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1                            |
| <b>CYP19A1</b>         | : Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1                            |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b> | : Distile H <sub>2</sub> O                                                          |
| <b>dk</b>              | : Dakika                                                                            |
| <b>DMRT1</b>           | : Doublesex and mab-3 related transcription factor 1                                |
| <b>DNA</b>             | : Deoksiribonükleik asit                                                            |
| <b>DND1</b>            | : Dead end homolog 1                                                                |
| <b>dNTP</b>            | : Deoksiribonükleotid trifosfat                                                     |
| <b>EIF2B</b>           | : Eukaryotic Initiation factor 2b                                                   |
| <b>EMX2</b>            | : Empty spiracles homeobox 2                                                        |
| <b>ESR1</b>            | : Estrogen receptor 1                                                               |
| <b>EtBr</b>            | : Ethidium bromide                                                                  |

|                                |                                                |
|--------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>FGF2</b>                    | : Fibroblast growth factor 2                   |
| <b>FGF7</b>                    | : Fibroblast growth factor 7                   |
| <b>FIGL<math>\alpha</math></b> | : Factor in the germline alpha                 |
| <b>FMR1</b>                    | : Fragile X mental retardation 1               |
| <b>FMRP</b>                    | : Frajil X mental retardasyon proteini         |
| <b>FOXL2</b>                   | : Forkhead box protein L2                      |
| <b>FOXO1</b>                   | : Forkhead box O1                              |
| <b>FOXO3</b>                   | : Forkhead box O3                              |
| <b>FSH</b>                     | : Folikül stimüle edici hormon                 |
| <b>FSH<math>\beta</math></b>   | : FSH beta                                     |
| <b>FSHR</b>                    | : FSH reseptör                                 |
| <b>FST</b>                     | : Follistatin                                  |
| <b>FXS</b>                     | : Frajil X mental retardasyon sendromu         |
| <b>FXTAS</b>                   | : Frajil X ile ilişkili tremor ataksi sendromu |
| <b>GALT</b>                    | : Galaktoz 1-fosfat üridil transferaz          |
| <b>GDF9</b>                    | : Growth differentiation factor 9              |
| <b>GH</b>                      | : Granüloza hücresi                            |
| <b>g</b>                       | : Gram                                         |
| <b>GnRH</b>                    | : Gonadotropin serbestleştirici hormon         |
| <b>GnRHR</b>                   | : GnRH reseptörü                               |
| <b>INH<math>\alpha</math></b>  | : İnhibin alfa                                 |
| <b>kb</b>                      | : Kilo baz                                     |
| <b>KITL</b>                    | : KIT ligand                                   |
| <b>LHX9</b>                    | : LIM homeobox 9                               |
| <b>LIF</b>                     | : Leukaemia inhibitory factor                  |
| <b>LH</b>                      | : Luteinleştirici hormon                       |
| <b>LHR</b>                     | : LH reseptör                                  |
| <b>LHX8</b>                    | : LIM homeobox 8                               |
| <b><math>\mu</math>g</b>       | : Mikrogram                                    |
| <b><math>\mu</math>l</b>       | : Mikrolitre                                   |
| <b>ml</b>                      | : Mililitre                                    |
| <b>mTOR1</b>                   | : Mammalian target of rapamycin complex 1      |

|               |                                                                   |
|---------------|-------------------------------------------------------------------|
| <b>NANOS</b>  | : Nanos homolog 3; Drosophila                                     |
| <b>NOBOX</b>  | : NOBOX oogenesis homeobox                                        |
| <b>NR5A1</b>  | : Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1                 |
| <b>p</b>      | : Kromozom kısa kolu                                              |
| <b>pg</b>     | : Pikogram                                                        |
| <b>PGH</b>    | : Primordial germ hücreleri                                       |
| <b>PHPT1A</b> | : Psödohipoparatiroidizm tip 1-a                                  |
| <b>PITX1</b>  | : Pituitary homebox 1                                             |
| <b>PISRT1</b> | : Polled intersex syndrome regulated transcript 1                 |
| <b>POY</b>    | : Prematür over yetersizliği                                      |
| <b>PRDM1</b>  | : PR domain containing 1                                          |
| <b>PRDM14</b> | : PR domain containing 14                                         |
| <b>PTEN</b>   | : Phosphatase and tensin homolog                                  |
| <b>PZR</b>    | : Polimeraz zincir reaksiyonu                                     |
| <b>RSPO1</b>  | : R-spondin 1                                                     |
| <b>q</b>      | : Kromozom uzun kolu                                              |
| <b>SF1</b>    | : Steroidogenic factor 1                                          |
| <b>sn</b>     | : Saniye                                                          |
| <b>SOHLH1</b> | : Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1 |
| <b>SOHLH2</b> | : Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2 |
| <b>SOX9</b>   | : SRY related HMG box 9                                           |
| <b>StAR</b>   | : Steroidojenik akut regülatör protein                            |
| <b>SYM1</b>   | : Proximal symphalangism                                          |
| <b>TAF4B</b>  | : TATA box binding protein associated factor                      |
| <b>TBP2</b>   | : TATA-binding protein 2                                          |
| <b>TGF-B</b>  | : Transforming growth factor beta                                 |
| <b>TGFBR3</b> | : Transforming growth factor, beta receptor III                   |
| <b>TS</b>     | : Turner sendromu                                                 |
| <b>TSC1</b>   | : Tuberous sclerosis complex 1                                    |
| <b>U</b>      | : Unit                                                            |
| <b>UTR</b>    | : Untranslated region                                             |
| <b>V</b>      | : Volt                                                            |

|                                 |                                            |
|---------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>WNT4</b>                     | : Wingless-related MMTV integration site 4 |
| <b>WT1</b>                      | : Wilms tumor 1                            |
| <b>3<math>\beta</math>-HSD</b>  | : 3 $\beta$ hidroksiteroid dehidrogenaz    |
| <b>17<math>\beta</math>-HSD</b> | : 17 $\beta$ hidroksiteroid dehidrogenaz   |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Folikül sayısının yaşam dönemlerindeki değişimi                                                                | 4  |
| Şekil 2.2. Primordial germ hücre formasyonu, oogenez ve folikülogenezde rol alan faktörler                                | 5  |
| Şekil 2.3. PI3K/AKT yolağının folikül aktivasyonu ve arresti ile ilişkisi                                                 | 7  |
| Şekil 2.4. Primordial folikül aktivasyonu                                                                                 | 9  |
| Şekil 2.5. <i>FOXL2</i> geninin yapısı                                                                                    | 30 |
| Şekil 2.6. Gonad gelişimi                                                                                                 | 32 |
| Şekil 2.7. Folikülogenez boyunca <i>FOXL2</i> 'nin rolü                                                                   | 35 |
| Şekil 2.8. BMP15 protein yapısı                                                                                           | 36 |
| Şekil 2.9. Oosit-kumulus hücre sinyal yolağı                                                                              | 37 |
| Şekil 2.10. Oosit folikül gelişiminde KITL BMP15 etkileşimi                                                               | 39 |
| Şekil 4.1. 41, 40, 39, 50, 26, 49, 19, 18, 17, 16, 15,14, 13, 47, 46 ve 45 nolu olgulara ait fragman analizi PZR ürünleri | 52 |
| Şekil 4.2. Fragman analizi yapılan olgu 46'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü                                         | 53 |
| Şekil 4.3. Fragman analizi yapılan olgu 50'ye ait kapiller elektroforez görüntüsü                                         | 53 |
| Şekil 4.4. <i>BMP15</i> geni c.-9 C>G homozigot normal saptanan olgu 11'e ait dizi analizi görüntüsü                      | 55 |
| Şekil 4.5. <i>BMP15</i> geni c.-9 C>G heterozigot mutant saptanan olgu 12'ye ait dizi analizi görüntüsü                   | 55 |
| Şekil 4.6. <i>BMP15</i> geni c.-9 C>G homozigot mutant saptanan olgu 46'ya ait dizi analizi görüntüsü                     | 56 |
| Şekil 4.7. <i>BMP15</i> geni c.308 A>G heterozigot mutant saptanan olgu 12'ye ait dizi analizi görüntüsü                  | 56 |
| Şekil 4.8. <i>BMP15</i> geni c.352 G>A heterozigot mutant saptanan olgu 77'ye ait dizi analizi görüntüsü                  | 57 |
| Şekil 4.9. <i>FOXL2</i> geni c.501 C>T ve c.536 C>G heterozigot mutant saptanan olgu 10'a ait dizi analizi görüntüsü      | 58 |

**Şekil 4.10.** *FOXL2* geni c.672 A>T heterozigot mutant saptanan olgu 1’e ait dizi analizi görüntüsü 58

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1.</b> X kromozomu üzerinde bulunan POY ile ilişkilendirilmiş genler                           | 16 |
| <b>Tablo 2.2.</b> X kromozomu üzerinde bulunan POY aday genleri                                           | 16 |
| <b>Tablo 2.3.</b> Otozomal kromozomlar üzerinde bulunan POY ile ilişkilendirilmiş genler                  | 23 |
| <b>Tablo 2.4.</b> Otozomal kromozomlar üzerinde bulunan POY aday genleri                                  | 23 |
| <b>Tablo 3.1.</b> Besiyeri içeriği                                                                        | 41 |
| <b>Tablo 3.2.</b> Fragman analizinde kullanılan primerler                                                 | 42 |
| <b>Tablo 3.3.</b> Fragman analizi PZR karışımının hazırlanışı                                             | 42 |
| <b>Tablo 3.4.</b> Fragman analizi PZR koşulları                                                           | 43 |
| <b>Tablo 3.5.</b> <i>FOXL2</i> ve <i>BMP15</i> genleri dizi analizinde kullanılan primer dizileri         | 45 |
| <b>Tablo 3.6.</b> Elde edilen PZR ürünü uzunlukları                                                       | 45 |
| <b>Tablo 3.7.</b> <i>FOXL2</i> ve <i>BMP15</i> genleri için hazırlanan PZR karışımlarının içerikleri      | 45 |
| <b>Tablo 3.8.</b> <i>FOXL2</i> geni dizi analizi PZR koşulları                                            | 46 |
| <b>Tablo 3.9.</b> <i>BMP15</i> geni dizi analizi PZR koşulları                                            | 46 |
| <b>Tablo 3.10.</b> <i>FOXL2</i> ve <i>BMP15</i> genleri dizi analizi PZR karışımı içerikleri ve koşulları | 47 |
| <b>Tablo 4.1.</b> Tüm hastaların tanı yaşı, tanısı ve hormonal değerleri                                  | 49 |
| <b>Tablo 4.2.</b> <i>BMP15</i> geninde bulunan değişiklikler                                              | 54 |
| <b>Tablo 4.3.</b> Hasta ve kontrol grubunda <i>BMP15</i> c.-9 C>G genotiplerinin dağılımı                 | 55 |
| <b>Tablo 4.4.</b> <i>FOXL2</i> geninde bulunan değişiklikler                                              | 57 |
| <b>Tablo 5.1.</b> <i>BMP15</i> geni mutasyonlarının sıklığı                                               | 60 |
| <b>Tablo 5.2.</b> c.-9 C>G ve c. 308 A>G varyantının hasta ve kontrol grubundaki dağılımı.                | 63 |



## 1. GİRİŞ

Prematür over yetersizliği (POY) 40 yaşından önce ovaryan fonksiyonların durması (düzenli menstrüel siklusların 4-6 aydan uzun süre kesilmesi) nedeni ile oluşan amenore durumu olarak tanımlanmaktadır. Bu tanı birkaç hafta ara ile yapılan en az iki folikül stimüle edici hormon (FSH) ölçümünün menopozal düzeyde (40 IU/I ve üzeri) saptanması ile konur (1,2). Bu klinik tablo aynı zamanda hipergonadotropik hipogonadizm olarak da adlandırılmaktadır. 40 yaşın altındaki kadınlarda görülme sıklığı yaklaşık % 1-2, 30 yaşın altındaki kadınlarda görülme sıklığı ise % 0.1'dir (3).

POY'lu hastaların klinik başvurularında özellikle sıcak basması gibi vazomotor semptomlarla beraber pollaküri, disüri, vajinitis ve dispareni gözlenmektedir. Eşlik eden bulgu olarak kilo kaybı, anoreksiya, abdominal ağrı ve güçsüzlük görülebildiği bildirilmiştir (4). POY klinik olarak insan yaşamına etki eden iki önemli sonuca neden olmaktadır. Bunlar hipoöstrojenizm ve infertilitedir. Hipoöstrojenizm bu hastalarda osteoporoz, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalık riskini arttırmaktadır (5). POY olan genç kadınlarda seks steroidlerinin eksikliği, doğal olarak menopoza giren kadınlarda olduğundan daha uzun sürmektedir. Bunun sonucu olarak bu kadınlarda osteoporoz riski anlamlı derecede artmaktadır (6).

POY sonuçlarından biri olan hipoöstrojenizm hormon replasmanı ile tedavi edilse bile diğer bir sonucu olan infertilitenin tedavisi çok zor olmaktadır. POY tanılı hastaların yaklaşık % 50'si değişen derecelerde rezidüel over fonksiyonuna sahiptirler. Bu hastaların sadece % 5-10'unda spontan gebelik görülebilmektedir (7).

POY etyolojisinde genetik, otoimmün, metabolik, enfeksiyon ve iatrojenik (antikanser tedavileri) gibi birçok faktör rol oynamaktadır. Genetik faktörler içerisinde POY'a neden olabilecek çok sayıda gen tanımlanmış olmakla birlikte *BMP15* (Bone morphogenetic protein15) ve *FOXL2* (Forkhead box protein L2) genleri bunların en önemlileri arasında yer almaktadır. Araştırmamıza POY ön tanısı ile takip edilen, kromozom analizi normal ve *Fragil X* premutasyonu taşımayan 79 hasta dahil edilmiş ve bu hastalarda dizi analizi yöntemi ile *BMP15* ve *FOXL2*

genlerinde mutasyon taraması gerçekleştirilmiştir. Planlanan bu alışma POY’lu hastaların erken tanınmasını sağlayacak belirteçlerin saptanması ve dolayısıyla POY’lu kadınlara üreme hayatlarını erken planlama imkanının sağlanması açısından önem arz etmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

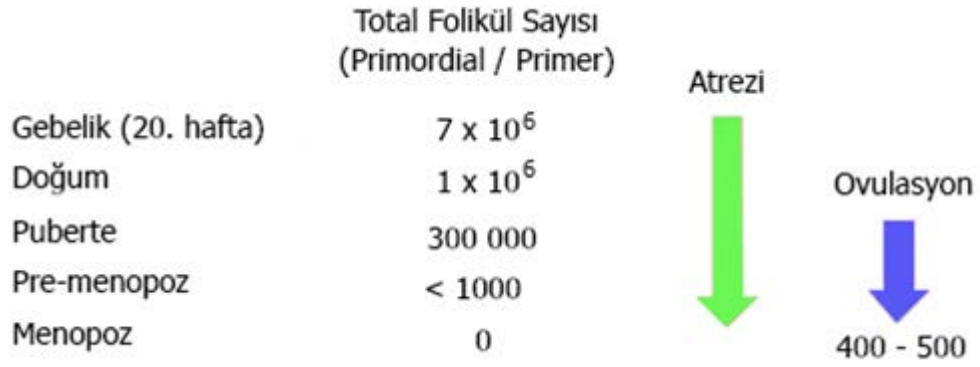
### 2.1. Oogenez ve Folikülogenez

Primordial folikül bir kadının reproduktif hayatının süresinin belirlenmesinde önem arz etmektedir. Sessiz fazda bekleyen bu foliküller süreç boyunca primer folikül, preantral ve antral folikül safhalarını tamamlar. Gonadotropinlerin etkisi ile dominant folikül seçimi ve ovulasyon ile süreç tamamlanır. Bu süreçte birçok faktör rol almaktadır.

#### 2.1.1. Primordial Germ Hücre ve Folikül Formasyonu

Oositlerin öncü formu olan primordial germ hücrelerinin (PGH) oluşumu *BMP2* (endoderm kökenli), *BMP4* ve *BMP8b* (ektoderm kökenli) sinyalleri ile gerçekleşmektedir (8,9). Endodermal kökenli 1.000-2.000 kadar PGH gebeliğin 5-6. haftalarında yolk sak'tan genital çıkıntıya (ridge) göç ederek burada mitotik bölünmeye başlar. Gonada ulaşan PGH sayısı 6. haftada 10.000, 8. haftada 600.000, 20. haftada 6-7 milyona ulaşır (10).

20. haftadan sonra düşüş başlar ve yenidoğanda 1 milyon ve pubertede 300.000-400.000 kadar kalır. Kadının reproduktif yaşamı boyunca 400-500 kadar germ hücresi ovule olur. İkinci hızlı azalma dönemi ise germ hücre sayısının kritik değer olan 25.000'lere ulaştığında, ortalama 37-38'li yaşlarda görülür. Bu dönemden itibaren FSH artarken, menstrual sikluslar kısaltmaya başlar ki bu durum oositlerin tükenme zamanıyla yerleşen menopoza kadar devam eder (11). Menopoz öncesi ise bu hücrelerin sadece 1.000 kadarı kalmaktadır (Şekil 2.1) (12).



**Şekil 2.1.** Folikül sayısının yaşam dönemlerindeki değişimi. Persani ve ark. 2010'dan değiştirilerek alınmıştır (5).

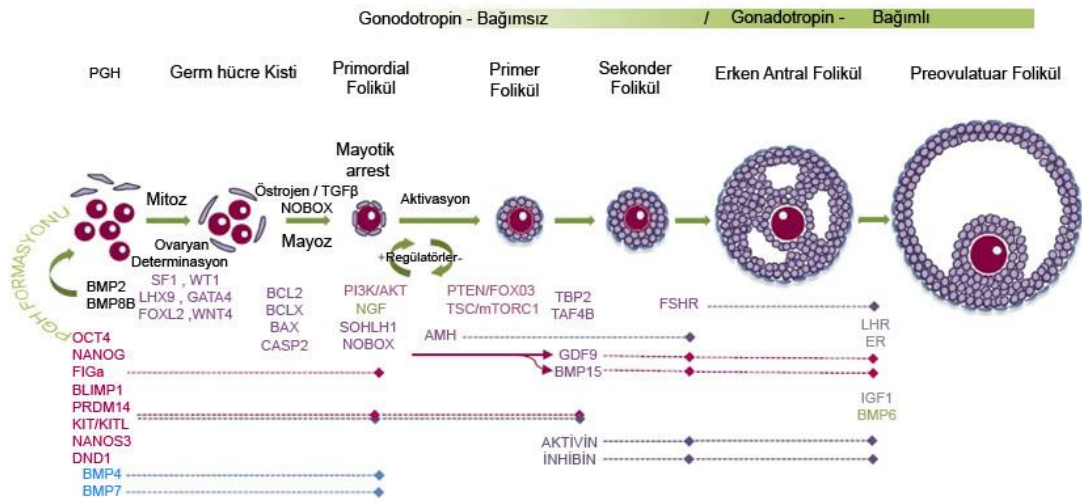
PGH'lerin migrasyon ve proliferasyonunda birçok faktörün etkili olduğu bilinmektedir. İn vitro çalışmalarda *Bmp2* ve *Bmp4*'ün fare PGH'lerinin sayısını arttırırken, *Bmp7* knockout farelerde PGH'lerin sayısının azaldığı gösterilmiştir (13-15). BLIMP1 (PRDM1, PR domain containing 1), PRDM14 (PR domain containing 14) PGH'lerin migrasyon ve proliferasyonunda kritik rol oynamakla beraber *OCT4* ve *NANOG* PGH'lerin yaşamının devamı için gerekli faktörlerdir (16). Süreçte rol oynayan diğer bir faktör olan *FIGLα* (factor in the germline alpha) zona pellusida oluşumunda rol alan glikoproteinlerin erken ekspresyonundan sorumludur. *KIT/KIT ligand (KITL)* ve RNA bağlayan çinko parmak proteini olan *NANOS3* (nanos homolog 3; Drosophila) ve *DND1* (dead end homolog 1), PGH'leri apoptozdan korumakla görevlidir (17).

PGH'leri genital çukura ulaştıklarında cinsiyet oluşumu başlamaktadır. *Wilms tumor protein (WT1)*, steroidogenik faktör 1 (*SFI*), Chromobox homolog 2 (*CBX2*), Empty spiracles homeobox 2 (*EMX2*) ve LIM homeobox 9 (*LHX9*) genlerinin etkisi ile bipotansiyel gonad oluşmaktadır. Bipotansiyel gonaddan Wingless-type MMTV integration site family, member 4 (*WNT4*), R-spondin 1 (*RSP01*), Follistatin (*FST*), *FOXL2* ve  $\beta$  catenin genlerinin etkisiyle over gelişimi olmaktadır (18).

PGH'leri overe ulaştığında oogonia adını alırlar. Overde kolonize olan PGH inkomplet sitokinez ile birlikte mitoz bölünme sonucunda germ hücre kisti ya da

germ hücre yuvası adı verilen formasyonu oluştururlar. Mitoz bölünme sonlanıp mayoz bölünme ve primer oosit oluşumu başlar. Böylece oogonial dönem biter ve oosit dönemi başlar. Mayozun başlaması ile primordial foliküllerde bulunan oositler birinci mayoz profazının diploten aşamasında durur. Ovulasyon oluncaya kadar hücre siklusunun G0 olarak adlandırılan dinlenme aşamasında bekler. Mayotik arest sırasında germ hücre kist yapısı değişip primordial folikül oluşumu başlamaktadır.

Germ hücre kist yapısının dağılması ile oositlerin bir kısmı apoptoza gider. Apoptoz primordial folikül havuzunun belirlenmesinde ana süreçtir. Birçok pro ve antiapoptotik gen bu süreçte rol oynar. Antiapoptotik rol oynayan *BCL2* (B-cell CLL/lymphoma 2) ve *BCLX* (BCL2-like 1) yokluğunda primordial folikül sayısında azalma gösterilmiştir (19,20). Proapoptotik rol oynayan *BAX* (BCL2-associated X protein) hücre ölümünü indükler. Yapılan çalışmalarda *BAX* yokluğunda primordial folikül sayısında artış gözlenmiştir (21). *Kaspaz 2* (Caspase 2-casp2)'nin aktivasyonu apoptoza yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda *kaspaz 2* yokluğunun primordial folikül sayısını artırdığı ifade edilmiştir (Şekil 2.2) (22).



**Şekil 2.2.** Primordial germ hücre formasyonu, oogenez ve folikülogenezde rol alan faktörler. Sanchez ve ark. 2012'den değiştirilerek alınmıştır (17).

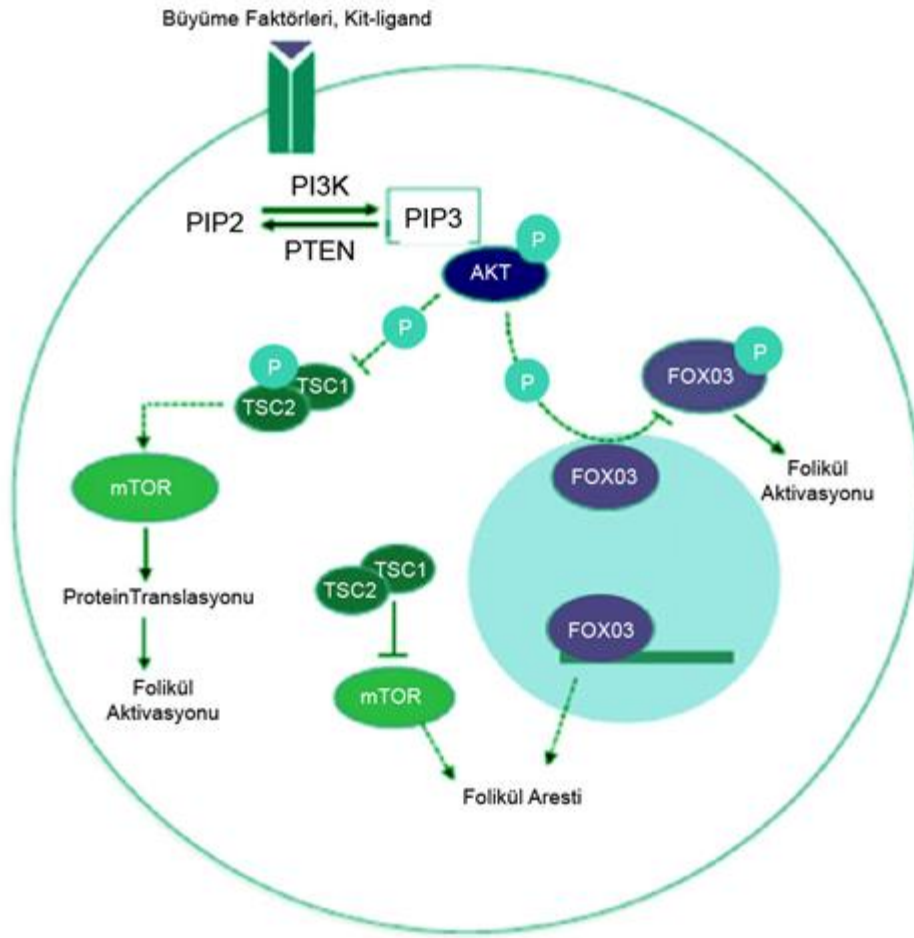
### 2.1.2. Primordial Folikül Oluşumu

İnsanda primordial folikül gelişimi en erken 16. haftada başlar ve en geç postnatal 6. ayda biter. Over rezervini temsil eden primordial foliküller tek katlı yassı pre-granülosa hücreleri ile çevrili diploten oositin (30-60 µm) oluşur. Oogoniada mitozun başlayıp granülosa hücreleri ile çevrilmesi yani folikül oluşumu onu atreziden korumaktadır zira 28. haftadan sonra mayoza girmemiş oogonia overde artık izlenmemektedir. Yenidoğan overinde de oogonia mevcut değildir.

### 2.1.3. Primordial Folikül Aktivasyonu ve Primer Foliküle Geçiş

Primordial foliküller daha sonra yıllar sürecektir olan sessiz faza girmektedirler. Folikülogenezin ilk dalgasından sonra primordial foliküller tekrar aktive olurlar. Aktive olan folikül sayısı, over rezervi ve söz konusu türün mono ya da polioovulasyon durumu ile ilişkilidir. Primordial folikül aktivasyonunda oluşabilecek bir düzensizlik over rezerv kaybına ve prematür menopoza yola açabilmektedir. Bu proses iyi bir şekilde regüle edilmekle beraber, primordial folikül aktivasyonunu tetikleyen sinyallerin mekanizması hala net olarak anlaşılamamıştır. Yapılan çalışmalar oosit ile granüloza hücresi (GH) arasındaki iletişimin bu süreçte anahtar rol oynadığını göstermiştir (23).

Primordial folikül aktivasyonu için birçok faktör gereklidir. Bunlardan bir tanesi *KITL*'dir. *KITL* GH'lerinde üretilir, reseptörü *KIT* ise oositte eksprese olmaktadır. *KIT* reseptör mutasyonu bulunan farelerde foliküler gelişim primer (folikül) aşamasında durmaktadır. GH farklılaşmayı başlatmasına rağmen oositler sessiz fazdan çıkamamaktadırlar (24). *KITL* ile oosit stimülasyonu *PI3K/AKT* yolağının aktivasyonuna bu da Forkhead box O3 A (*FOXO3A*) (fosforilasyonunun) inaktivasyonuna neden olmaktadır (25). Bu sonuçlar *PI3K/AKT* yolağının inhibitörleri olan *PTEN* ve *FOXO3A*'nın rolleri ile uyum göstermektedir. Oosit spesifik *Pten* knockout durumunda *PI3K/AKT* yolağı yapısal olarak aktive olmakta ve doğumu takip eden haftalar içerisinde primordial foliküller aktive olmaktadır (Şekil 2.3) (26).



**Şekil 2.3.** *PI3K/AKT* yolağının folikül aktivasyonu ve aresti ile ilişkisi. Sanchez ve ark. 2012'den değiştirilerek alınmıştır (17).

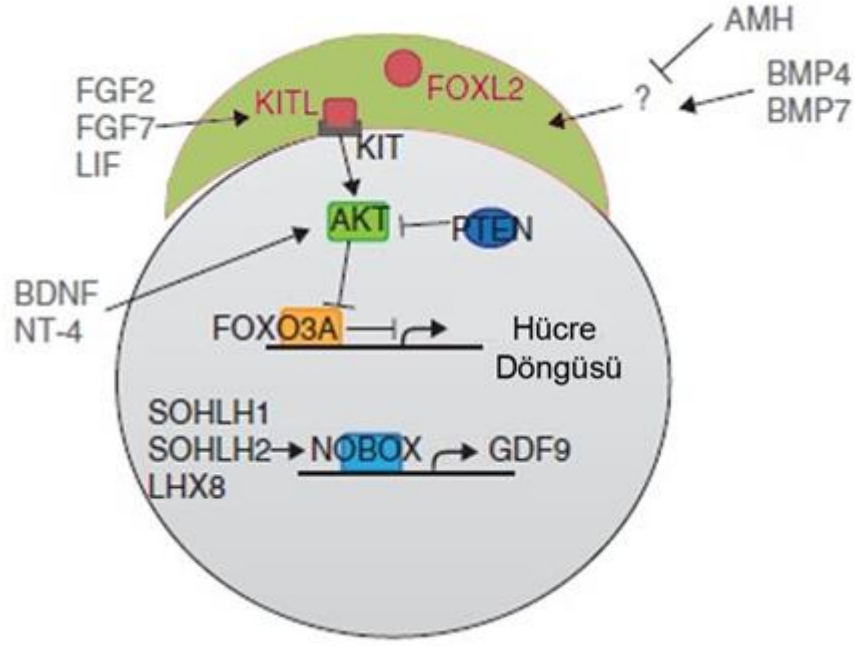
Yapılan başka bir çalışmada *Foxo3* mutant fare overinde primordial foliküllerin prematür aktivasyonu gösterilmiştir (27). Yolakta önemli diğer faktörler *TSC1* (tuberous sclerosis complex 1) ve *mTORC1* (mammalian target of rapamycin complex 1)'dir. *TSC1*, *mTORC1*'i baskılamakta ve foliküllerin sessiz fazda beklemesinin devamına neden olmaktadır (Şekil 2.4).

Folikülogenezde rolü olan bir başka faktör ise nörotrofinlerdir. Nörotrofinlerin primordial folikül aktivasyonunda rol aldığı gösterilmiştir (28). NTRK2 (Trk-b) reseptörü primordial folikülün oositinde eksprese olmaktadır (29). Ligandları BDNF ve NT4 primordial folikül aktivasyonu için gereklidir. NT4/BDNF-NTRK2 reseptör

kompleksi, *PI3K /AKT* yolağını uyarıp folikül aktivasyonuna neden olmaktadır (29). Aynı zamanda FGF2 (fibroblast growth factor 2), LIF (leukemia inhibitory factor) ve FGF7 (fibroblast growth factor 7); KITL ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan primordial folikül aktivasyonundan sorumlu diğer growth faktörlerdir (30-32).

Antimüllerian hormon (AMH), GH tarafından sentezlenmektedir. Over rezervinin devamında anahtar faktör görevini üstlenmektedir. AMH'nin primordial folikül aktivasyonunu baskıladığı, negatif feed back mekanizmasıyla aşırı folikül gelişimini önlemek amacıyla bu baskılamayı yaptığı düşünülmektedir. *Amh*<sup>-/-</sup> farelerde aşırı primordial folikül aktivasyonuna ve foliküler rezerv kaybına neden olduğu gösterilmiştir (33). AMH, BMP bağımlı faktörlerin (SMAD1, SMAD5 ve SMAD8) aktivasyonunu indükler. Bununla beraber diğer BMP faktörleri (BMP4, BMP7 gibi) farelerde folikül aktivasyonunda rol oynar (34). AMH'nin, BMP4 ve diğer uyarıcı faktörlerin üretimini baskıladığı düşünülmektedir (35).

Bu geçiş sürecinde yassı granüloza hücreleri küboidal hale dönüşmekte ve oosit çapı da artmaktadır (36). Aktivasyonda ve geçişte rol oynayan oosit kökenli önemli diğer faktörler ise SOHLH1 (spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1), SOHLH2 (spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2), LHX8 (LIM homeobox 8) ve NOBOX (NOBOX oogenesis homeobox)'tır. *NOBOX* ekspresyon eksikliğinde oosit primordial safhadan çıkamayıp yassı granüloza hücrelerinin küboidal hale dönüşümü olamamaktadır. *NOBOX* ekspresyon eksikliği aynı zamanda oosit gelişiminin farklı birçok basamağında rol alan *MOS*, *OCT4*, *RFPL4*, *FGF8*, *ZAR1*, *DNMT10*, *GDF9*, *BMP15* ve *H100* gibi faktörlerin down regülasyonuna neden olmaktadır (37). Benzer şekilde *Sohlh1* null mutant farelerde yapılan çalışmalarda primordial safhada arest gelişmektedir. Bu faktörün ekspresyon eksikliği *Nobox* geninin down regülasyonuna ve *Nobox* geninin regüle ettiği yukarıda belirtilen genlerinde down regülasyonuna neden olmaktadır (38). *Sohlh2* ve *Lhx8* eksikliğinde foliküler arest geliştiği gösterilmiştir (39,40). Bu bilgiler ışığında *SOHLH1* ve *NOBOX* başta olmak üzere bu faktörlerin erken oogenez ve folikülogenezde anahtar rol oynadığı kabul edilmektedir.



**Şekil 2.4.** Primordial folikül aktivasyonu. Georges ve ark. 2014'ten değiştirilerek alınmıştır (41).

#### 2.1.4. Primer Folikülden Sekonder Foliküle Geçiş

Bu evreye geçişte aktivatör olarak *Aktivin*, *GDF9*, *BMP15*, TATA-binding protein 2 (*TBP2*), TATA box binding protein (TBP)-associated factor (*TAF4B*); inhibitör olarak ise *AMH* rol almaktadır (17).

#### 2.1.5. Preantral ve Antral Dönem

Granüloza hücrelerinin mitotik ekspansiyonu ile tek tabakalı primer foliküller çok tabakalı hale gelirler. Preantral ve antral dönemde oosit çapı artmakta ve bazal lamina, zona pellusida ve teka hücreleri bu dönemde oluşmaktadır (42). Bu dönemde ayrıca antral boşluk oluşmaktadır. Bu dönemde rol alan birçok faktör gösterilmiştir. *GDF9* ve *BMP15* bunlardan iyi bilinen faktörler olup granüloza hücre proliferasyonunda sinerjik rol oynamaktadırlar. *GDF9* primer ve sekonder folikül sayısını arttırmaktadır (43). Oosit kaynaklı bir büyüme faktörü olan *BMP15*, FSH'dan bağımsız olarak granüloza hücrelerinin proliferasyonundan sorumludur.

Yani gonadotropin bağımlılığının olmadığı erken folikül büyümesi döneminde folikül büyümesini *BMP15* sağlayabilmektedir. *BMP15* ilginç olarak FSH reseptör ekspresyonunu inhibe edebilmektedir. FST *BMP15*'in bu etkilerini antagonize etmektedir (44). Bu süreçte folikül büyümesinde rol alan diğer faktörler Aktivin ve İnhibin'dir (45). Folikül büyüme sürecinde aktivin etkisi azalırken inhibinin etkisi artış göstermektedir. AMH insanda folikül büyümesinin mid-antral safhasına kadar granüloza hücrelerinden salınmaktadır. Primordial → primer folikül geçişini inhibe etmesinin yanında preantral folikül gelişimi üzerinde de negatif bir etkiye sahiptir.

Preantral ve antral dönemde folikül gelişimi ve büyümesi FSH ve luteinleştirici hormon (LH) reseptör ekspresyonu ve FSH'nın indüklediği aromataz enzimi aktivitesi yoluyla gerçekleşmektedir. Belli sayıda antral folikülden oluşan bir grup sıklık olarak FSH'nın etkisi ile dominant folikül seçimi için yarışa girerler. Seçilen grup büyümeye devam ederken bu gruptaki antral foliküllerin gonadotropinlere olan yanıtlarının ve steroidogenik aktivitelerinin modüle edilmesi ve aynı zamanda olası bir prematür luteinizasyonun inhibe edilmesi kritik önem taşır. Bu sayede belli foliküller FSH'a daha duyarlı kılınarak dominant folikül seçimi için zemin oluşturulmaktadır.

Aktivin A, BMP6, BMP4 ve BMP7 daha büyük preantral ve antral foliküllerden salınarak daha küçük foliküllerin androjen desteğini azaltıp büyümelerini inhibe edici yönde etki etmektedirler. Folikül gelişimi ile daha fazla inhibin A ve FST salınımı olmakta, aktivin etki sahasını inhibin A'ya bırakmaktadır. İnhibin A artışı FSH'ı düşürmekte, bu durum LH ile indüklenen androjen sentezini arttırmakta böylece ovulasyon öncesi gerekli olan östradiol yüksekliği için substrat hazırlanmış olmaktadır. Oluşturulan bu ortam; *aktivin A*, *GDF9* gibi faktörlerin etkisi ile daha fazla FSH ve LH eksprese eden foliküller ile daha fazla aromataz aktivitesi taşıyan foliküllerin, ileri aşamalarda daha az substratı daha etkili kullanmalarına ve sonuç olarak atreziden kurtulup dominant folikül olarak seçilmelerini sağlamaktadır (46).

## 2.2. Menopoz ve Fizyolojisi

Dünya genelinde menopoz için kesin bir yaş belirlemek olası değildir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, menopoz yaşının ortalama 51 yaş olduğu bildirilmiştir. Fakat bu rakam ülkelere göre farklılıklar gösterir. Ülkemiz için belirtilen menopoz yaşı 48-51 yaş arasındadır (47). Menopozdan hemen sonra overde foliküllerin tükenmesiyle beraber FSH'da 10-20 kat, LH'da ise yaklaşık üç katlık artış görülür. Bu artıştaki farklılığın sebebi hormonların yarılanma süreleridir. LH'nın yarılanma ömrü 20 dakika (dk) iken FSH'nın yarılanma ömrü 3-4 saattir. LH için inhibin gibi negatif feedback yapacak spesifik bir faktörün olmaması da bu duruma etki etmektedir.

Postmenopozal overler primer olarak androstenedion ve testosteron salgırlar bununla beraber bu hormonların asıl kaynağı adrenal bezlerdir. Menopoz öncesine göre androstenedion seviyesi menopoz sonrasında yarı seviyeye kadar düşer. Dehidroepiandrosteron ve dehidroepiandrosteron sulfat adrenal bezlerde üretilmekte olup yaşlanmayla birlikte azalırlar.

Testosteron üretimi menopozdan sonra yaklaşık % 25 kadar azalır. Testosteronun primer kaynağı, androstenedionun periferik dönüşümü olduğu için ve androstenedion miktarı postmenopozal dönemde belirgin olarak azaldığı için total testosteron üretimi postmenopozal dönemde azalmıştır. Postmenopozal dönemde dolaşımdaki östradiol değeri 10-20 pg/ml kadardır. Bu değerin çoğu, östronun periferdeki dönüşümünden elde edilmektedir. Postmenopozal dönemdeki kadında östronun seviyesi östradiolden belirgin olarak fazladır, östronun seviyesi yaklaşık 30-70 pg/ml kadardır. Menopoz sonrasında östrojenindeki belirgin azalmaya bağlı, androjen/östrojen oranı değişir. Bunun sonucunda hafif hirsutismus yaygın olarak görülür. Menopoz sonrasında overler östrojen üretmeye devam etmezler, ancak postmenopozal kadınlarda östrojen seviyesi belirgin olabilir. Bunun nedeni testosteron ve androstenedionun ekstrasgladuler dokularda östrojene dönüşümüdür. Androstenedionun östrojene dönüşüm yüzdesi vücut ağırlığı ile doğru orantılıdır, çünkü yağların androjenleri östrojene aromatize etme özellikleri vardır. Ayrıca diğer dokularda da az miktarda da olsa aromatisasyon mevcuttur (48).

Menopozda östrojen eksikliğine bağlı ortaya çıkan değişiklikler akut dönemde vazomotor semptomlar, atrofik değişiklikler, kognitif değişiklikler, psikofizyolojik etkiler; kronik süreçte kardiyovasküler sistem ve kemik dokusunda oluşan değişiklikler olarak sıralanabilir. Pubertal gelişimi sağlamak, östrojen eksikliği semptomlarını tedavi etmek ve bunun uzun dönemde bırakabileceği sekelleri en aza indirmek amacı ile hormon tedavisi uygulanmaktadır.

Primer amenore ile seyreden POY'da düşük doz ile başlayıp giderek artan östrojen tedavisi; eş zamanlı olarak sekonder seks karakterlerinin gelişiminin izlenmesi ve daha geç bir dönemde, endometriumun korunması amacı ile siklik progestajen verilmesidir.

Sekonder amenoresi olan ve pubertal gelişimini tamamlamış olan hastalara standart hormon tedavisi uygulanarak; vazomotor semptomların kontrol altında tutulması, kardiyovasküler risk ve osteoporoza ilişkin sorunların en aza indirilmesi ve bunların yanında normal cinsel fonksiyonun sürdürülmesi amaçlanmaktadır.

### **2.3. Genetik Nedenler**

POY'lu vakaların % 74-90'ında altta yatan mekanizma bilinmemektedir (49). Bununla beraber ailesel POY vakaları incelendiğinde patogenezinde genetik mekanizmanın olduğu düşünülmektedir (50). POY'un genetik etyolojisinde birçok gen sorumlu tutulmuştur.

#### **Ailesel POY**

Ailesel vakaların tüm POY'lu vakaların % 4 ile % 30 arasında değişen bir insidansa sahip olduğu bildirilmiştir (51). Ailesel yatkınlığın erken bir zamanda bilinmesi, gelişecek olan menopozun tahminini sağlamakla beraber POY şüphelenilen kadında gebelik zamanının planlanmasında rehberlik yapmaktadır (52).

### 2.3.1. X Kromozomu Defektleri

X kromozomu anöploidileri ve X kromozomu yapısal anomalilerinin oluşturduğu X kromozom defektleri POY'a neden olmaktadır. X kromozom anöploidileri POY vakalarının yaklaşık % 13'ünü oluşturmaktadır (53). Bu anomalilerden en sık görülen monozomi X (Turner sendromu (TS))'tir. TS, X kromozomunun komplet veya komplete yakın yokluğu sonucu primer amenore ile karakterize ovaryan disgenezis, kısa boy ve karakteristik fenotipik bulgulardan oluşmaktadır (54). Prevelansı canlı doğumda 1/2500'dir (54). 45,X karyotipine sahip kadın hastalarda mayoz bölünmenin profaz safhasının erken dönemlerinde oosit kaybı görülmekte, sonuç olarak gonadal disgeneziye ve erken çocukluk dönemlerinden itibaren artmış FSH ile karakterize primer amenoreye neden olmaktadır (55). POY'u açıklayan mekanizma over fonksiyonları için X'e bağlı genlerden iki doz olması gerekirken X'e bağlı genlerin tek doz yetmezliğidir (56). TS hastalarının yaklaşık % 10'unda menarş görülürken, Pasquino ve ark. yaptıkları çalışmada mozaik TS hastalarının % 30-40 kadarının spontan puberteye ulaştığını saptamışlardır (57,58). TS'de spontan gebelik vakaların % 1.8 ile % 7.6'sında görülmektedir. Bu gebeliklerde % 3-% 40 arasında canlı doğum görülmektedir. Bu oran oosit donasyonu ile % 45-% 60'a çıkabilmektedir. Gebeliklerin yarısına yakını hipoplastik uterus gibi uterin anomaliler nedeni ile kaybedilmektedir. Bu hastaların gebeliklerinde kardiyovasküler komplikasyonlar (preeklampsi, aort diseksiyonu vb.) risk oluşturmaktadır. TS kadınlarda aort diseksiyonu nedeni ani anne ölümünün oranının yaklaşık % 2 olduğu tahmin edilmektedir (59).

Genel popülasyonda kadınlarda 1/1000 görülmekte olan trizomi X'in POY ile birlikteliği bildirilmiştir (60). İlk kez 1959 yılında POY'lu trizomi X sendromu tanımlanmıştır (61).

Yapısal anomaliler arasında en yaygın olan değişiklik Xq izokromozomdur. Bu hastalar TS stigmalarına sahiptir ve çizgi gonad görülür.

Dengeli otozomal translokasyonlara karşın, özellikle X kromozomu uzun kolunu içeren X-otozomal translokasyonlar POY'a daha sık neden olmaktadır. X kromozomu uzun kolunda Xq13.2 ve Xq27 bölgeleri arasındaki bölgeler ovaryan fonksiyon açısından kritik bölge olarak kabul edilmiştir. POY ile ilişkili en sık görülen kırık noktalarını içeren iki bölge tanımlanmıştır. Bu bölgeler POF1 (Xq26-qter) ve POF2 (Xq13.3-q21.1)'dir. X kromozomunun kısa kolunda yer alan yeniden düzenlenmelerin de POY'a neden olduğu gösterilmiştir. Özellikle Xp11.1 ve Xp21 arasındaki bölgenin POY için kritik bölge olduğu ifade edilmiştir (59).

### **2.3.2. X Kromozomu Üzerinde Bulunan POY Genleri**

#### **2.3.2.1. *FMRI* Geni**

*FMRI* (Fragile X mental retardation 1) geni Xq27.3'te lokalizedir. 5' UTR (untranslated region) bölgesinde lokalize üçlü nükleotid tekrarının (CGG) artması hastalığa neden olmaktadır. Tekrar sayısına göre 3 tip alel tanımlanmıştır: normal (6-54), premutasyon (55-200) ve full mutasyon (>200) alelleri (62). Full mutasyon en sık görülen kalıtsal mental retardasyon formu olan Frajil X mental retardasyon sendromuna (FXS) neden olmaktadır. Trinükleotid tekrar sayısındaki artış hipermetilasyona neden olmakta ve Frajil X mental retardasyon proteini (FMRP) üretilmemektedir. FXS insidansı erkeklerde 1:4000, kadınlarda ise 1:4000-8000'dir (63).

Premutasyon FXS'dan farklı olarak iki kliniğe neden olur. Bunlardan biri Frajil X ilişkili tremor ataksi sendromudur (FXTAS). Primer olarak erkekleri etkileyen nörolojik bir bozukluktur. Diğeri ise POY'dur.

*FMRI* premutasyonlu kadınlarda POY görülme sıklığı % 13-26 olarak bildirilmiştir. Aile öyküsü olmayan sporadik POY'lu kadınlarda görülme sıklığı % 0.8-7.5'tir. Ailevi primer over yetersizliği olan kadınlarda % 13'e ulaşmaktadır (63). Premutasyonda, CGG tekrar sayısı ile POY riski arasında ilişki vardır. Hasta ve taşıyıcılara genetik danışmanlık verilmesi gereklidir. Danışmanlıkta; infertilite, erken

menopoz, premutasyonun kalıtım riski ve etkileri, ailedeki diğer bireylerin de etkilenmiş olma olasılığı anlatılmalıdır.

POY olan tüm kadınlara *FMRI* premutasyonu için genetik tarama önerilmelidir. ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists) ve ASRM (American Society for Reproductive Medicine) açıklanamayan POY olgularına *FMRI* premutasyonu taraması yapılmasını önermektedir (64,65).

*FMRI* geni oositlerde de eksprese olmaktadır. *FMRI* premutasyonunun POY'a neden olma mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen bunun ovaryan folikülleri üzerinde toksik işlev kazanımının neden olabileceği üzerinde durulmuştur (62).

#### **2.3.2.2. *FMRI* Geni**

Bazı hastalarda FXS gibi sitogenetik değişiklik olmasına rağmen *FMRI* mutasyonu saptanmamıştır. Sutherland ve Baker bu hastalarda ikinci bir frajil bölgeyi belirlemişler ve bu bölgeyi FRAXE olarak sembolize etmişlerdir (66). FRAXE, FRAXA bölgesine yaklaşık olarak 150-600 kb uzaklığında Xq28 bölgesinde lokalize folat duyarlı bir bölgedir. Yapılan bir kohort çalışmada 209 POY'lu kadından 32'sinde (% 15) *FMRI* bölgesinde delesyon saptanmıştır (67).

#### **2.3.2.3. *POF1B* Geni**

Xq21.2'de lokalize olan bu gen daha önceden X kromozomu üzerindeki kritik bölgede haritalanmıştır. Lacombe ve ark. yaptıkları çalışmada Lübnanlı bir ailenin yaşları 29 ile 41 arasında değişen beş POY'lu bireyinden en az ikisinde osteoporoz ve diş problemleri belirtilmiştir. Bu kardeş bireylerin *POF1B* geninde R329Q değişikliğini saptamışlardır (68). X kromozomu üzerinde bulunan POY ile ilişkilendirilmiş ve aday genler Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'de gösterilmektedir.

**Tablo 2.1.** X kromozomu üzerinde bulunan POY ile ilişkilendirilmiş genler (59).

| <b>İlişkili Gen</b> | <b>Lokus</b> |
|---------------------|--------------|
| <i>FMR1</i>         | Xq27.3       |
| <i>FMR2</i>         | Xq28         |
| <i>BMP15</i>        | Xp11.2       |
| <i>POF1B</i>        | Xq21.2       |

**Tablo 2.2.** X kromozomu üzerinde bulunan POY aday genleri (59).

| <b>Aday Gen</b> | <b>Lokus</b> | <b>Aday Gen</b> | <b>Lokus</b> |
|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
| <i>CHM</i>      | Xq21.2       | <i>AGTR2</i>    | Xq22-23      |
| <i>DIAPH2</i>   | Xq21.33      | <i>BHLHB9</i>   | Xq23         |
| <i>DACH2</i>    | Xq21.3       | <i>ZFX</i>      | Xp21.3       |
| <i>XPNPEP2</i>  | Xq25         | <i>SHOX</i>     | Xp22.33      |
| <i>NXF5</i>     | Xq22         | <i>UTP14A</i>   | Xq26.1       |
| <i>XIST</i>     | Xq13.2       | <i>PCDH19</i>   | Xq22.1       |
| <i>CENP1</i>    | Xq22.1       | <i>VCX</i>      | Xp22         |
| <i>PGRMC1</i>   | Xq22-q24     | <i>STS</i>      | Xp22.32      |
| <i>AR</i>       | Xq12         | <i>BCORL1</i>   | Xq25-Xq26.1  |
| <i>FOXO4</i>    | Xq13.1       | <i>TSPAN7</i>   | Xp11.4       |
| <i>AIFM1</i>    | Xq26.1       |                 |              |

### 2.3.3. Otozomal Kromozomlarda Bulunan POY Genleri

#### 2.3.3.1. *NOBOX* Geni

*NOBOX* geni 7q35'te lokalizedir. Yapılan fare çalışmalarında *Nobox* gen ekspresyon kaybında oosit kaybının hızlandığı gösterilmiştir. Qin ve ark.'ın yaptığı çalışmada beyaz ırk kökenli 96 POY hastasında yapılan mutasyon analizinde bir kadında *NOBOX* geninde R355H değişikliği saptanmıştır (69). Yapılan başka bir çalışmada 178 POY tanılı kadının % 6.2'sinde mutasyon saptanmıştır (70).

#### **2.3.3.2. *FIGLα* Geni**

*FIGLα* (Factor In the Germline alpha) geni 2p13.3'te lokalizedir. Oosit spesifik transkripsiyon faktörünü kodlayan bu gen folikülogenezde ve zona pellusida formasyonunun oluşumunda rol almaktadır. Zhao ve ark.'ın yaptığı çalışmada POY tanılı Çinli 100 kadında yapılan mutasyon analizinde iki kadında *FIGLα* geninde 22 ve 3 baz çiftlik (bç) delesyon saptanmıştır (71).

#### **2.3.3.3. *NR5A1 (SF1)* Geni**

*NR5A1* (Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1) geni 9q33'te lokalizedir. Lourenco ve ark.'ın yaptığı çalışmada izole 25 POY hastasından ikisinde mutasyon saptanmışlardır. Hastalarda, p.L231\_L233del, p.G123A ve p.P129L değişiklikleri saptanmıştır (72).

#### **2.3.3.4. *STAG3* Geni**

*STAG3* geni 7q22.1'de lokalizedir. Filistinli bir ailenin 6 kızının 4'ünde primer amenore saptanmıştır. 4 kız kardeşte küçük gelişmemiş göğüs, çizgi gonad ve amenore saptanmıştır. Yapılan incelemede boylarının ve uteruslarının normal olduğu saptanmıştır. Aile öyküsünde teyzelerinin primer amenore olduğu öğrenilmiştir. Yapılan moleküler incelemelerinde hastaların *STAG3* geninde 1 bç'lik delesyona sahip oldukları gösterilmiştir (73,74).

#### **2.3.3.5. *HFM1* Geni**

*HFM1* geni 1p22.2'de lokalizedir. Wang ve ark. yaptıkları çalışmada aralarında POY tanılı Çinli 25 ve 27 yaşında iki kız kardeşte ve 29 yaşında POY tanısı almış bir kadında inceleme yapmış, hastalarda normal uterus ve normalden biraz küçük over tespit etmişlerdir. Yapılan moleküler incelemede hastalarda *HFM1* geninde compound heterozigot mutasyon saptanmıştır (75).

#### **2.3.3.6. FSH Reseptör (FSHR) Geni**

FSH folikülogenez boyunca ovaryan foliküllerin korunması ve gelişimi açısından çok önemli role sahiptir. *FSHR* geni 2p21-p16'da lokalizedir. Aittomaki ve ark. 6 Finlandiyalı ailede *FSHR* geninde missense mutasyon rapor etmişlerdir (76). *FSHR* geninin C566T mutasyonu sonucu hastalarda hipergonadotropik ovaryan disgenezi gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki *FSHR* genindeki mutasyonlar FSH ile stimülasyonundan sonra dramatik şekilde bağlanma kapasitesini ve c-AMP üretimini azaltmaktadır. Yapılan çalışmalarda yeni mutasyonlar da bildirilmiştir (77-79).

İngiltere'de yapılan çalışmalarda *FSHR* gen mutasyonları ile POY arasındaki ilişkinin nadir olduğu gösterilmiştir (80-83). POY'lu hastalarda yapılan *FSHR* gen çalışmalarında ovaryan fonksiyon açısından herhangi bir patofizyolojik önemi olmayan polimorfizm varlığı gösterilmiştir (81,84,85).

#### **2.3.3.7. LH Reseptör (LHR) Geni**

*LH reseptörü* geni 2p21'de lokalizedir. Latronico ve ark. klinik olarak amenoresi ve LH'a karşı rezistansı bulunan bir hastada *LH* geninde 1660. pozisyonda timidinin sitozine dönüşümü ile sonuçlanan homozigot değişim saptamışlardır. Aynı zamanda etkilenen kadının kardeşinde Leydig hücre hipoplazisi saptanmıştır (86).

#### **2.3.3.8. FSH Beta (FSH $\beta$ ) Geni**

Normal gonadotropin (FSH ve LH) salınımı ve sağlam hipotalamo-hipofizer-ovaryan aks, ovarian fonksiyonlar için hayati önem arz etmektedir. Ciddi gonadotropin reseptör/post reseptör defektleri erken folikül atrezisi veya hiposensitivitesine bu da POY'a neden olmaktadır (87). *FSH $\beta$*  geni 11p13'te lokalizedir. Matthews ve ark. primer amenoreli bir vakada *FSH $\beta$*  geninde mutasyon saptamışlardır (88). Yapılan başka bir çalışmada POY tanılı 18 kadında *FSH $\beta$*  geninde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır (80).

#### **2.3.3.9. *LH Beta (LH $\beta$ ) Geni***

*LH $\beta$*  geni 19q13.32'de lokalizedir. Takahashi ve ark. POY'lu kadınlarda kontrol grubuna göre *LH $\beta$*  genindeki mutasyon prevalansının artmış olduğunu rapor etmiştir (89). Daha sonra yaptıkları başka bir çalışmada ovulatuvar problemleri olan kadınlarda *LH $\beta$*  geninde beş sessiz polimorfizm rapor edilmiştir (90).

#### **2.3.3.10. *Inhibin Alfa (INH $\alpha$ ) Geni***

Inhibin glikoprotein yapıda gonadal bir hormon olup hipofizden FSH sentezini ve sekresyonunu inhibe eder. Bu nedenle inhibin geninin POY etyolojisinde etkin bir gen olduğu düşünülmektedir. Erken foliküler fazda artmış FSH düzeyi ve düşük inhibin B düzeyi reproduktif yaşlanma (91) ve over rezervinde azalma ile ilişkilendirilmiştir (92). POY'da düşük serum inhibin düzeyinin varlığı inhibinin POY patofizyolojisindeki rolünü daha da desteklemektedir (93). *INH $\alpha$*  2q35'te lokalizedir ve inhibin A-inhibin B kompleksinin alfa subunitini kodlamaktadır. *INH $\alpha$*  genindeki G769A değişikliği POY ile ilişkilendirilmiştir (94-96). Prevelansı ise % 0-11 arasında farklılık göstermektedir (96,97).

#### **2.3.3.11. *POLG Geni***

*POLG* geni insan mitokondriyal DNA polimeraz  $\gamma$  enzimini kodlamaktadır. Bu gendeki mutasyonlar progresif eksternal oftalmoplejiye neden olmaktadır. POY bu sendromun bir komponenti olarak karşımıza çıkmaktadır. Luoma ve ark. erken menopozlu ve progresif eksternal oftalmoplejisi olan bir hasta rapor etmişlerdir. Yedi ailenin bireylerinin mitokondriyal DNA sekansı yapılmış ve mutasyon bildirilmiştir. Sorumlu gen 15q25'te lokalizedir. Yapılan çalışmalar *POLG* mutasyonlarının Parkinsonizm ile ilişkili olabileceğini de göstermektedir (98).

#### **2.3.3.12. *EIF2B* Geni**

Fogli ve ark. ovaryan yetmezlik ve beyaz cevher anormallikleri bulunan 8 aileden karyotip olarak normal 7 hastada yaptıkları bir çalışmada *EIF2B* (eukaryotic initiation factor 2b) geninin 5 subunitine ( $\alpha$ - $\epsilon$ ) yönelik değişiklikleri araştırmış ve *EIF2B*'nin beş geninden üçünde (*EIF2B2*-14q24.3, *EIF2B4*-2p23.3, *EIF2B5*-3q27) mutasyon saptamışlardır (99). Bununla birlikte, yapılan başka bir çalışmada herhangi bir nörolojik semptomu olmayan veya lökodistrofi tanısı almayan POY tanılı 93 kişide bu mutasyonlardan hiçbirini saptanmamıştır. Yazarlar *EIF2B* mutasyonlarının pür spontan POY'un yaygın olmayan bir nedeni olduğu sonucuna varmışlardır (100).

#### **2.3.3.13. *NOG* (*NOGGIN*) Geni**

*NOG* geni 17q22'de lokalizedir ve noggin proteinini kodlamaktadır. *NOG* geninin mutasyonları, proksimal eklem ankilozu, tarsal ve karpal kemik füzyonu, brakidaktili ve iletim tipi işitme kaybı ile giden proksimal simfalangizme (Proximal symphalangism, SYM1) neden olmaktadır (101). *NOG* geni overde eksprese olup *BMP* antagonisti olarak çalışmaktadır ve ovaryan fonksiyonlar açısından önemli rol oynamaktadır (102). Kosaki ve ark. *NOG* mutasyonu saptanmış POY ve SYM1'li bir vaka sunmuşlardır. *NOG* geninin *BMP* antagonisti olarak çalışması *NOG* mutasyonunun POY riskini artırabileceğini desteklemektedir (103).

#### **2.3.3.14. *GDF9* Geni**

*GDF9* geni 5q31.1'de lokalizedir ve *TGF- $\beta$*  ailesine bağlı bir protein kodlamaktadır. *GDF9* oositte eksprese olmaktadır. BMP15 ile heterodimer oluşturabilen *GDF9*'un folikülogenezde ana rol oynayan faktörlerden olduğu düşünülmektedir. POY tanılı Hintli, Çinli ve beyaz ırk kökenli kadınlarda yapılan çalışmalarda *GDF9* geninin mutasyonları saptanmıştır (104,105).

#### **2.3.3.15. *TGFBR3* Geni**

*TGFBR3* (Transforming Growth Factor, Beta Receptor III) geni 1p33-p32'de lokalizedir ve TGF $\beta$  tip III reseptörünü kodlamaktadır. Mutasyonları inhibin aracılı FSH regülasyonunun kaybına neden olmaktadır. POY tanılı Hintli kadınlarda yapılan bir çalışmada *TGFBR3* geninin POY ile ilişkisi gösterilmiştir (106).

#### **2.3.3.16. *NANOS3* Geni**

*NANOS3* (Nanos homolog 3 (Drosophila)) geni 19p13.13'te lokalizedir ve RNA-bağlayan çinko parmak proteinini kodlamaktadır. POY tanılı 80 Çinli ve 88 beyaz ırk kökenli kadında yapılan bir çalışmada bu gene ait mutasyonların varlığı gösterilmiştir (107).

#### **2.3.3.17. *FOXO1* ve *FOXO3* Genleri**

*FOXO1* (Forkhead box O1) 13q14'te ve *FOXO3* 6q21'de lokalizedir. Bu genler Forkhead gen ailesinin üyesidir. 90 kişilik bir çalışmada bir hastada *FOXO1* ve iki hastada *FOXO3* mutasyonu saptanmıştır (108).

#### **2.3.3.18. *ESR1* Geni**

*ESR1* (estrogen receptor 1) geni 6q25.1'de lokalizedir. Yapılan çalışmalarda Çinli, Koreli ve Alman kökenli POY tanılı kadınlarda bu genin POY ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Sırlı kadınlarda yapılan çalışmada ise ilişki saptanamamıştır (109,110).

#### **2.3.3.19. *CDKN1B* Geni**

*CDKN1B* (Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 1B (P27, Kip1)) geni 12p13.1-p12'de lokalizedir. *CDKN1B* geni ile ilgili POY tanılı Tunuslu 87 hastada yapılan bir çalışmada mutasyon varlığı gösterilmiştir (111).

#### **2.3.3.20. *CITED2* Geni**

*CITED2* (Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2) geni 6q23.3'te lokalizedir. *CITED2* geni ile ilgili POY tanılı Tunuslu ve Avusturyalı hastalarda yapılan bir çalışmada c.604 C>A (p.P202T) değişikliği saptanmıştır (112).

#### **2.3.3.21. *DMC1* ve *MSH5* Genleri**

*DMC1* (DNA Meiotic Recombinase 1) geni 22q13.1'de, *MSH5* (MutS Homolog 5) geni 6p21.3'te lokalizedir. POY tanılı 41 kadında yapılan bir çalışmada Afrika kökenli bir kadında *DMC1* geninde homozigot M200V ve beyaz ırk kökenli iki kadında ise *MSH5* geninde heterozigot P29S değişikliği saptanmıştır (113). Otozomal kromozomlar üzerinde bulunan POY ile ilişkilendirilmiş ve aday genler Tablo 2.3 ve Tablo 2.4'te gösterilmektedir.

**Tablo 2.3.** Otozomal kromozomlar üzerinde bulunan POY ile ilişkilendirilmiş genler (59).

| İlişkili Gen                 | Lokus    | İlişkili Gen                   | İlişkili Gen |
|------------------------------|----------|--------------------------------|--------------|
| <i>FSHR</i>                  | 2p21-p16 | <i>PMM1</i>                    | 22q13.2      |
| <i>LHR</i>                   | 2p21     | <i>INHA</i>                    | 2q35         |
| <i>FSH<math>\beta</math></i> | 11p13    | <i>GDF9</i>                    | 5q31.1       |
| <i>LH<math>\beta</math></i>  | 19q13.32 | <i>TGFBR3</i>                  | 1p33-p32     |
| <i>GNAS</i>                  | 20q13.3  | <i>NOBOX</i>                   | 7q35         |
| <i>FOXL2</i>                 | 3q23     | <i>NANOS3</i>                  | 19p13.13     |
| <i>GALT</i>                  | 9p13     | <i>FIGL<math>\alpha</math></i> | 2p13.3       |
| <i>AIRE</i>                  | 21q22.3  | <i>FOXO1</i>                   | 13q14.1      |
| <i>StAR</i>                  | 8p11.2   | <i>FOXO3</i>                   | 6q21         |
| <i>CYP17A1</i>               | 10q24.3  | <i>ESR1</i>                    | 6q25.1       |
| <i>CYP19A1</i>               | 15q21.1  | <i>CDKN1B</i>                  | 12p13.1-p12  |
| <i>EIF2B2</i>                | 14q24.3  | <i>CITED2</i>                  | 6q23.3       |
| <i>EIF2B4</i>                | 2p23.3   | <i>NR5A1</i>                   | 9q33         |
| <i>EIF2B5</i>                | 3q27     | <i>DMC1</i>                    | 22q13.1      |
| <i>NOG</i>                   | 17q22    | <i>MSH5</i>                    | 6p21.3       |
| <i>POLG</i>                  | 15q25    | <i>STAG3</i>                   | 7q22.1       |
| <i>HFM1</i>                  | 1p22.2   |                                |              |

**Tablo 2.4.** Otozomal kromozomlar üzerinde bulunan POY aday genleri (59).

| Aday Gen        | Lokus    | Aday Gen        | Lokus        |
|-----------------|----------|-----------------|--------------|
| <i>PTHBI</i>    | 7p14     | <i>STAMBPL1</i> | 10q23.31     |
| <i>BCKDHB</i>   | 6q14.1   | <i>HSD3B2</i>   | 1p13.1       |
| <i>ACSL6</i>    | 5q31.1   | <i>HAO2</i>     | 1p13.3-p13.1 |
| <i>HK3</i>      | 5q35.2   | <i>CYP2E1</i>   | 10q26.3      |
| <i>BRSK1</i>    | 19q13.4  | <i>NRXN1</i>    | 2p16.3       |
| <i>ADAMTS19</i> | 5q23.3   | <i>PARK2</i>    | 6q25-q27     |
| <i>LAMC1</i>    | 1q31     | <i>CARD11</i>   | 7p22         |
| <i>PCMT1</i>    | 6q25.1   | <i>DHFR</i>     | 5q11.2-q13.2 |
| <i>DNAH5</i>    | 5p15.2   | <i>NR2F1</i>    | 5q14         |
| <i>NAIP</i>     | 5q13.2   | <i>MEF2C</i>    | 5q14.3       |
| <i>DUSP22</i>   | 6p25.3   | <i>CCNH</i>     | 5q13.3-q14   |
| <i>NUPR1</i>    | 16p11.2  | <i>SSBP2</i>    | 5q14.1       |
| <i>AKT1</i>     | 14q32.32 | <i>CSPG2</i>    | 5q14.3       |

**Tablo 2.4** (devam)

| <b>Aday Gen</b> | <b>Lokus</b> | <b>Aday Gen</b>  | <b>Lokus</b>  |
|-----------------|--------------|------------------|---------------|
| <i>SYCE1</i>    | 10q26.3      | <i>EIF4ENIF1</i> | 22q11.2       |
| <i>CPEB1</i>    | 15q25.2      | <i>DLX5</i>      | 7q22          |
| <i>CCBE1</i>    | 18q21.32     | <i>DLX6</i>      | 7q22          |
| <i>PMAIP1</i>   | 18q21.32     | <i>DSS1</i>      | 7q21.3        |
| <i>CTNNA3</i>   | 10q22.2      | <i>WT1</i>       | 11p13         |
| <i>ANKRD22</i>  | 10q23.31     | <i>WNT4</i>      | 1p36.23-p35.1 |
| <i>PTEN</i>     | 10q23.3      |                  |               |

#### **2.4. Metabolik Anormallikler ve POY**

GALT (galaktoz 1-fosfat üridil transferaz) metabolizmasındaki bozukluk ender bir otozomal resesif hastalık olan galaktozemiye yol açmaktadır. Avrupa’da ve Kuzey Amerika’da insidansı yaklaşık 1/30.000-1/50.000’dir (114). *GALT* geni 9p13’te lokalizedir. Yapılan çalışmalarda *GALT* geni ile ilgili 220’den fazla mutasyon bildirilmiştir (115). Bununla birlikte vakaların % 70’ten fazlasında Q188R ve K285N mutasyonları bu hastalığa yol açmaktadır (116). Galaktozemili hastaların % 60-70’inde POY bildirilmiştir (117,118). Galaktoz ve metabolitlerinin oositler üzerinde yaptığı harabiyet sonucu POY’a neden olduğu bilinmektedir (119). Galaktozeminin POY etyolojisi üzerindeki diğer bir etkisi ise gonadotropinlerin glikolizasyonundaki rolü ile gonadotropinlerin etkisini azaltması olarak bildirilmiştir. Galaktozemili hastalarda FSH ve izoformlarının nötral bir izoelektrik değere sahip oldukları ve FSH reseptörlerine afiniteleri yeterli düzeyde olsa da adenilat siklaz aktivasyonlarının yetersiz kaldığı çalışmalarda gösterilmiştir (120).

Folikülogenez boyunca kolesterolden ovaryan hormon sentezi olmaktadır. Bu süreçte rol oynayan enzimlerin çoğunluğu sitokrom *P-450* gen ailesi üyesidir (121). Steroidlerin androjene çevrimi teka hücrelerinde olmakta ve bu işlem için kolesterol mitokondri dış membranından iç membranına geçmek zorundadır. *StAR* (Steroidogenik akut regülatör protein) mitokondriyal fosfoprotein olup bu geçişten sorumludur (122). *StAR* geni 8p11.2’de lokalizedir. *StAR* geni mutasyonları

konjenital lipoid adrenal hiperplaziye neden olmakla beraber POY'a yol açmaktadır. Kolesterol birikimi nedeni ile ovaryan hücrelerin tahribi sonucu oluştuğu düşünülmektedir.

*CYP17A1* (Cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1) geni 10q24.3'te lokalizedir ve progestinlerin (pregnanolon ve progesteron) androjenlere (dehidroepiandrosteron ve androstenedion) dönüşümünü sağlar. *CYP17A1*'deki eksiklik adrenal ve ovaryan steroid sentezine etki eder. Bu durum hipergonadotropik hipoöstrojenizm ile karakterizedir ve antral fazın erken dönemlerinde folikül gelişiminin durması ile oluşan primer amenoreye neden olur.

*CYP19A1* (Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1) geni 15q21.1'de lokalizedir ve aromataz enzimini kodlamaktadır. Bu enzim androjenlerin östrojenlere dönüşümünde rol oynar (10). *CYP19A1* eksikliğinde folikül maturasyonu durmakta ve ardından ovaryan disgenezi oluşmaktadır. Conte ve ark. non-adrenal form psödohermafroid kliniği olan yenidoğan bir hastada aromataz eksikliği rapor etmişlerdir. 17 aylıkken yapılan laparotomide normal internal genitalya; histolojik incelemede multikistik over tespit edilmiştir. FSH çok yüksek saptanmakla beraber östrojen saptanamamıştır. Ekzon 10'da iki missense mutasyon rapor edilmiştir. Bu mutasyonlar 435. pozisyonda arjininin sisteinle (R435C), 437. pozisyonda sisteinin tirozinle (C437Y) yerdeğiştirmesine neden olmuştur (123).

3 $\beta$  hidroksiteroid dehidrogenaz (3 $\beta$ -HSD) ve 17 $\beta$  hidroksiteroid dehidrogenaz (17 $\beta$ -HSD) *P-450* gen ailesi üyesi olmamasına rağmen ovaryan steroid sentezinde önemli yer tutmaktadır. 3 $\beta$ -HSD,  $\Delta$ 5 steroidlerin (pregnenolon)  $\Delta$ 4 steroidlere (progesteron) dönüşümünü sağlamaktadır. Eksikliğinde etkilenen kız hastalar normal seksüel gelişimle beraber kronik anovulasyon ve primer amenore kliniğine sahiptirler. 17 $\beta$ -HSD ise androstenediolun testosterona çevriminde rol almaktadır (10).

Diğer bir gen ise *PMM1* genidir. Bu gen 22q13.2'de lokalize, fosfo manno mutaz 1'i kodlamaktadır. Bu enzimdeki defekt mannoz 6 fosfatın birikmesine ve mannoz 1 fosfata çevrilememesine neden olmaktadır (7). POY'un yanında ataksi, hiperrefleks,

hipotoni, eklem kontraktürleri ve epilepsi gibi nörolojik anormallikler de görülmektedir (124).

## 2.5. Otoimmünite

POY'un bazı vakaları immün sistem bozuklukları sonucu oluşan folikül harabiyeti ile meydana gelmektedir. POY ile birliktelik gösteren çok sayıda otoimmün hastalık vardır. En sık hipotiroidi eşlik etmekle beraber diğer sık otoimmün durumlar Addison, insülin bağımlı diabet, miyastenia gravistir. Normal karyotipe sahip 119 POY'lu hastada yapılan bir çalışmada % 27 oranında hipotiroidizm, % 2.5 oranında Addison hastalığı ve % 2.5 oranında ise Diabetes Mellitus tespit edilmiştir (125). POY vakalarının % 2-10'unun adrenal otoimmünite bozuklukları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bakalov ve ark. 123 POY'lu kadında yaptıkları çalışmada dördünde (% 3.2) indirek immünofloresan yöntemi ile adrenal antikörleri göstermişlerdir (126). Yazarlar spontan POY'lu hastalarda otoimmün adrenal yetmezliği saptamaya yönelik olarak adrenal antikörlerin bakılmasını tavsiye etmektedirler. POY aynı zamanda otoimmün poliendokrinopati kandidiazis ektodermal distrofi (APECED) sendromunun bir komponenti olarakda karşımıza çıkabilmektedir. POY APECED sendromu tip 1'de daha sık olarak görülmektedir (127). Sorumlu gen *AIRE* genidir ve 21q22.3'te lokalizedir. APECED hastaları ile yapılan bir çalışmada hastaların % 60'ında hipogonadizm saptanmıştır (128). POY'un otoimmün nedenleri arasında over antijenlerine karşı oluşan otoantikörler ve lenfositik ooforit de bulunmaktadır (129).

## 2.6. POY'un Diğer Nedenleri

Psödohipoparatiroidizm Tip 1-A (PHPT1A), Albright Herediter Osteodistrofisi olarak da adlandırılmaktadır. Bu sendrom *GNAS1* genindeki mutasyonlar nedeni ile oluşmaktadır. *GNAS1* geni 20q13.3'te lokalizedir ve kalıtımında parental imprinting rol oynamaktadır. Parathormon salgılandıktan sonra hedef organda etkinliğinin başlayabilmesi için parathormon reseptörü adenil siklazin Gs proteini ile birleşmesi

ve böylece siklik AMP oluşması gereklidir. PHPT1A'da Gs aktivitesinde azalma olmaktadır.

Bloom sendromu, Werner sendromu, Rothmund-Thomson sendromu, Fanconi anemisi, Nijmegen sendromu, Martsolf sendromu, Cockayne sendromu, Demirhan sendromu ve Perrault sendromu POY'un eşlik ettiği diğer sendromlardır (59,130).

Kemoterapi ve radyoterapinin POY'a yol açtığı bilinmektedir (131,132). Kemoterapi ve radyoterapinin etkisi yaşa ve doza bağlı olarak farklı sonuçlar göstermektedir. Prepubertal overlerin gonadotoksik ajanların etkisine daha dirençli oldukları bildirilmiştir (133). 600 cGy ve üstü dozların 40 yaş ve üzerindeki kadınlarda değişik sonuçlar göstermekle beraber POY'a neden olabileceği bildirilmiştir (134). Pelvik radyoterapi öncesinde cerrahi olarak overlerin radyoterapi sahası dışına taşınmasının over fonksiyonlarını korumada yardımcı olduğu da bildirilmektedir (135).

Kabakulak ooforiti (136), sigara (137), epilepsi (138), ağır metaller, çözücüler, zirai ilaçlar (böcek ilaçları), plastikler, endüstriyel kimyasallar, cerrahi operasyonlar diğer POY nedenleridir (49,139).

## **2.7. POY Hastalarına Yaklaşım ve Tedavi**

İatrojenik olmayan POY hastalarında kemik mineral dansitesinde azalma, over fonksiyonlarındaki azalma ile birlikte, amenore ortaya çıkmadan önce başlar. Sonuç olarak, amenore oluştuğunda kemik mineral dansitesi zaten azalmıştır (140). Hastaların yaklaşık % 50'sinde, tanıdan 18 ay sonra kemik mineral dansitesi anlamlı düzeyde azalmıştır, üçte ikisinin kemik mineral dansitesi değerleri ise hastaları kalça kırığı açısından yüksek risk grubuna sokmaktadır (141). POY olan hastalarda androjenlerin düzeyinin düşük olmasından dolayı bu olgulara androjen verilmesi, kemik yapısının güçlenmesini ve sürdürülmesini olumlu şekilde etkileyebilir (140).

Androjen eksikliğinin, libido azlığı, genital ve öznel uyarılma yetersizliği, orgazm sorunları, motivasyon eksikliği, kendini iyi hissetmeme ve erken yorulmanın önemli

bir nedeni olduğuna inanılmaktadır (142). Hipoaktif cinsel istek bozukluğu olarak tanımlanan libido azlığı, hasta için çok sıkıntı verici olabilir. Cinsel uyarılabilirlik düzeyinin normale döndürülmesi ve hipoaktif cinsel istek bozukluğu ile ilişkili stresin azaltılmasında, östrojenler ile birlikte testosteron ya da dehidroepiandrosteron replasmanı ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir (143). POY'lu kadınlara hormon replasman tedavisi ideal tedavi şeklinde uygulanmaktadır. Bu tedavi uygulanırken hormon replasman tedavisinin uzun dönemde oluşabilecek riskleri dikkate alınarak hastanın bilgilendirilmesi, izlemi ve tarama testleri ihmal edilmemelidir.

Yapılan çalışmalarda POY'lu hastaların spontan gebe kalma oranları % 5-10 arasında saptanmıştır (7). Literatürde klomifen, gonadotropinler ya da gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) analogları ve gonadotropin kombinasyonu ile ovülasyonun indüksiyonunun, gebelik oluşma şansını fazla bir oranda arttırmadığı gösterilmiştir (144-146).

Bazı çalışmalar radyasyonun gonadlar üzerindeki etkisinin transpozisyon ile minimize edilebileceğini göstermiştir (147-149). Transpozisyon bölgesinin dikkatli seçilmesi, hem koruyucu etkiyi en fazla düzeye çıkarmak hem de radyasyonun gonadotoksik etkilerini en aza indirmek açısından önem taşımaktadır (150). Hipotalamus-hipofiz-over ekseninin işleyişinin baskılanması kemoterapinin gonadotoksik etkilerini azaltmak açısından önerilmiş olup etkili olduğu düşünülmektedir (147).

Donör oosit kullanılarak yapılan in vitro fertilizasyon, fertilitenin sağlanmasında kullanılabilecek bir yöntemdir. Her embriyo transferinde canlı doğum oranı % 30-40 civarında olmaktadır (7). Fertilitenin tekrar sağlanabilmesi için uygulanan diğer bir uygulama ise oosit ya da over dokusunun ototransplantasyon yapılmak üzere kriyo ile (dondurularak) saklanmasıdır (7,151). Kansere hastalarında bu tekniği kullanırken en önemli endişe malign hücrelerin ya da mikroskopik tümör kalıntılarının yeniden hastaya implante edilebilmesi olasılığıdır (152). Olgun ya da olgunlaşmamış oositin kriyo yöntemi ile saklanması, ümit vaadedici sonuçları olan alternatif bir yöntemdir. Yardımcı üreme tekniklerinin kanser hastalarının anlamlı bir

kısmına olası bir çözüm sunuyor olması gerçeğine karşın, kemoterapiye başlamayı geciktirdiği için hastalığın yayılma riskini de beraberinde getirdiği akılda tutularak dikkatle uygulanmalıdır (147).

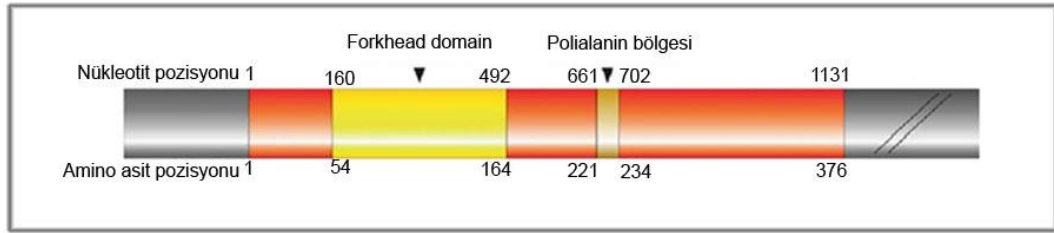
POY hastalarında over rezervinin bilinmesi POY'un prelinik evresinde olan ve ayrıca gonadotoksik tedavinin planlanma aşamasında olan hastaların tedavisi açısından önemlidir. Over rezervi ölçümünde FSH ölçümü, hormon tedavisi, inhibin A ve B ile AMH; overin, GnRH agonist uyarı testi, klomifen sitrat testi, ekzojen FSH over rezerv testi, insan menopozal gonadotropin uyarı testi gibi dış uyaranlara yanıtının araştırılması ve biyofiziksel belirteçler kullanılmaktadır. Biyofiziksel belirteçler arasında, over volümünün hesaplanması, antrum foliküllerinin sayılması, ultrasonografi ile over stromasındaki kan akımının ölçülmesi ya da over biyopsi materyalinde over folikül yoğunluğunun araştırılması gibi yöntemler yer almaktadır (153,154). Over rezervini doğru olarak gösteren ve over fonksiyonlarının sonlanacağı zamanı güvenilir bir şekilde önceden gösteren tek bir test yoktur. Her ne kadar klinik, biyokimyasal ve biyofiziksel belirteçler ümit verici gibi görünse de bu metodlardan herhangi birinin rutin klinik kullanımını önermeden önce, bunlara ilişkin daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

POY hastalarının multidisipliner bir yaklaşımla uzun dönem izlenmesi, tedavi hedeflerinin, hastanın ilerleyen yaşına ve bireysel gereksinimlerine göre modifiye edilmesi gerekir.

## **2.8. *FOXL2* Geni**

*FOXL2* 3q23'te lokalizedir ve tek ekzona sahiptir. 2.7 kb'lık, 376 aa uzunluğunda winged heliks domain-forkhead transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Protein forkhead DNA bağlanma domaini ile 14 rezidüel polialanin dizisinden oluşmaktadır (Şekil 2.5) (155). İnsan, fare ve keçide yapılan ekspresyon çalışmalarında gelişmekte olan göz kapağı mezenşiminde, over granüloza hücrelerinde ve hipofiz tiotrop ve gonadotrop hücrelerinde varlığı gösterilmiştir. *FOXL2* proteini transkripsiyon faktörü olması özelliği ile de uyumlu olarak çekirdekte lokalizedir. Mutasyonlarının

proteinin yanlış lokalizasyonuna, agregasyonuna ve transaktivasyonda bozulmaya neden olduğu bildirilmiştir (156,157). *FOXL2* geninin mutasyonları blefarofimozis pitozis epikantus inversus sendromuna (BPES) yol açmaktadır (158). BPES nadir görülen göz kapak anomalileri ile seyreden otozomal dominant bir hastalıktır. İki formu vardır. Tip 1 POY ile ilişkili iken, Tip 2'nin POY ile ilgisi yoktur. BPES'li hastaların yaklaşık % 90'ında *FOXL2* geninin mutasyonları saptanmaktadır. Bu mutasyonların % 70'i intragenik mutasyonlardır (155).



**Şekil 2.5.** *FOXL2* geninin yapısı. Beysen ve ark. 2005'ten değiştirilerek alınmıştır (159).

### 2.8.1. *FOXL2* ve Cinsiyet Gelişimi

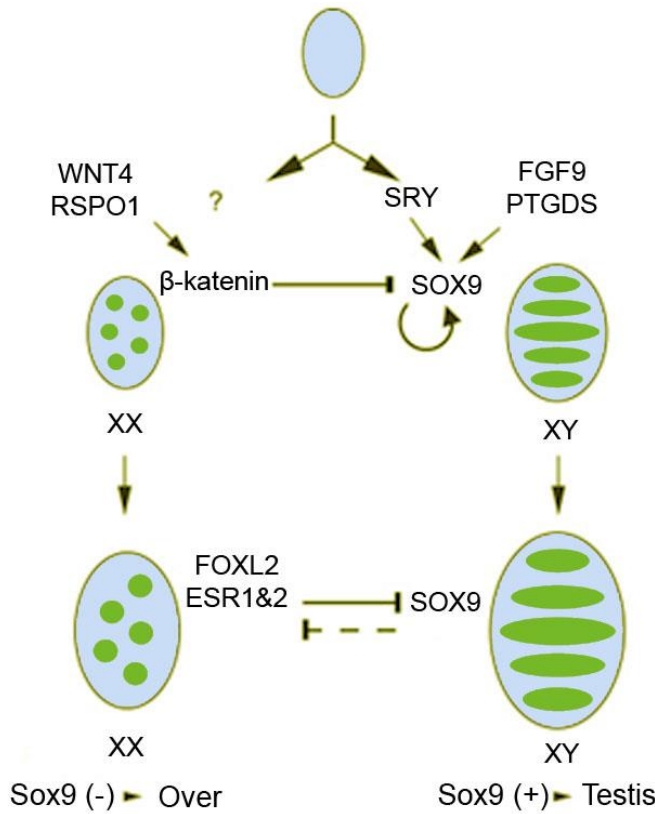
Erkek cinsiyet gelişiminde ilk olay Y kromozomu üzerinde lokalize *SRY* geninin eksprese olmasıdır. Bu olay *NR5A1*, *WT1*, *GATA4-FOG2* kompleksinin kontrolü altındadır (160,161). *SRY*, *NR5A1* geni ile birlikte *SOX9* geninin aktivasyonunu sağlamaktadır. XX bireylerde *SOX9* olmadığından kadın cinsiyeti yönünde gelişime neden olmaktadır.  $\beta$  katenin sinyal yolağı ile ilişkili birçok faktör over gelişiminde rol almaktadır. Özellikle yolağının iki pozitif efektörü *WNT4* ve *RSPO1* fonksiyonel over gelişimi için gereklidir (Şekil 2.6) (162,163).

Yapılan fare çalışmalarında *Foxl2*'nin erken bir over belirteci olduğu gösterilmiştir. *Foxl2*<sup>-/-</sup> farelerin doğuma kadar normal gelişim gösterdikleri fakat perinatal herhangi bir cinsiyet dönüşümünün saptanmadığı gözlenmiştir (164,165). *Foxl2*'nin farelerde over gelişiminin erken döneminde etkin olmadığı görülüyor gibi olsa da diğer

memelilerde yapılan birçok çalışmada over gelişiminde önemli role sahip olduğu gösterilmiştir.

Polled interseks sendromu keçilerde XX cinsiyet dönüşümüne neden olan bir sendromdur. *FOXL2* ve *PISRT1* (polled intersex syndrome regulated transcript 1) transkriptlerinin ekspresyonu etkilenmektedir. Yapılan çalışmalarda *PISRT1* disregülasyonunun gözlenen fenotipi açıklamadığı gösterilmiştir (166). Keçilerde fetal gelişim süresince *FOXL2* inaktivasyonu en mantıklı hipotez olarak görülmektedir. Bu güne kadar ne insanda ne de farede *FOXL2* mutasyonlarının aşikar olarak cinsiyet dönüşümüne neden olduğunun gösterilememesi, bu durumun türe spesifik farklılıklardan kaynaklandığını düşündürmektedir (41).

Son çalışmalar farelerde cinsiyet kimliğinin yetişkin dönem boyunca devam ettiğini göstermiştir. Yetişkin XY farelerin sertoli hücrelerinde transkripsiyon faktörü olan *Dmrt1*'in delesyonunun *Foxl2* ekspresyonuna neden olduğu ve sertoli hücrelerinin granüloza benzeri hücrelere dönüştüğü gösterilmiştir (167). Karşılıklı olarak *FOXL2* de kadında GH'lerin korunmasında rol oynamaktadır. *Foxl2* delesyonu farelerin GH'lerinde sertoli hücre belirteçlerinin artışına ve overde seminifer tübülü hatırlatan yapıların oluşmasına neden olmaktadır (168). Aynı fenotip farede östrojen reseptörlerinin (*Esr1* ve *Esr2*) delesyonunda ya da östrojen üretim bozukluğunda görülmektedir. Bu durum GH kimliğinin devam sürecinde *FOXL2* ve östrojen reseptörleri arasındaki fonksiyonel birlikteliğin varlığını düşündürmektedir. *FOXL2* direk olarak östrojen reseptörleri ile etkileşmekte, *Esr1* ile birlikte *Sox9*'un baskılanmasını sağlamaktadır (168).



**Şekil 2.6.** Gonad gelişimi. Uhlenhaut ve ark. 2009’den değiştirilerek alınmıştır (168).

*FOXL2* birçok türün GH’lerinde östrojen üretiminin son basamağından sorumlu olan aromatazı kodlayan *Cyp19A1*’in pozitif regülatörü olarak fonksiyon görmektedir (168). Bu durum *FOXL2*’nin direk veya indirek olarak östrojen üretimine etki ettiğini göstermektedir. *FOXL2*, *Sox9* represyonunun yanında *FST* ekspresyonu için de gereklidir. GH’lerde *FST* delesyonu over rezerv kaybına ve overde sertoli benzeri hücrelerin formasyonuna neden olmaktadır. Bu durum *FOXL2* delesyonu sonucu oluşan fenotipe oldukça benzemektedir. Veriler değerlendirildiğinde *FST*’nin *FOXL2*’nin hedef molekülleri arasında olduğunu düşündürmektedir (169,170).

### 2.8.2. *FOXL2*’nin Folikülogenezdeki Rolü

Günümüze kadar, GH farklılaşmasında transkripsiyonel düzeyde birkaç belirteç tanımlanmış olup *FOXL2* bunlardan bir tanesidir. *Foxl2*<sup>-/-</sup> fareler doğuma kadar normaldirler. Bununla beraber doğumdan 2 hafta sonra yapılan over incelemelerinde

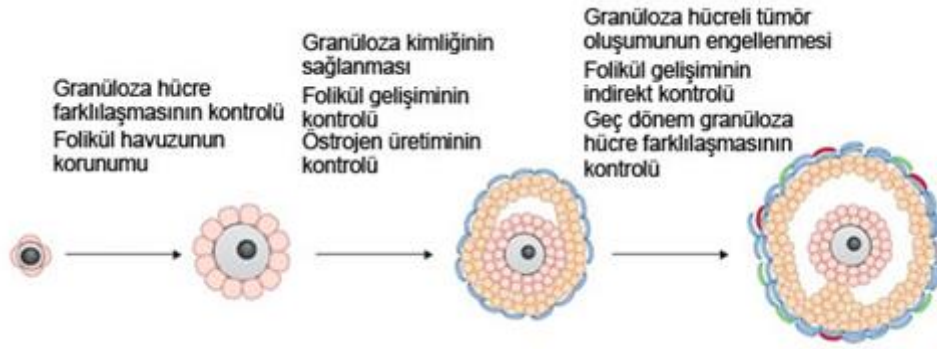
aşırı büyük oositler ve çevreleyen tek tabaka GH'lerinden oluşan foliküller izlenmiş, daha sonraki maturasyon aşamalarında da normal folikül yapısına rastlanamamıştır. İlerleyen haftalarda massif folikül aktivasyonu gözlenmeye başlamakla beraber küboidal GH'si izlenmemektedir. Bu aktive olan foliküllerin oositleri hızlıca apoptoza gider ve foliküler rezervin kaybını provake eder (164,165). FOXL2'nin insanda da benzer rol oynamasından dolayı faredeki bu fenotip insan POY'unu hatırlatmaktadır. Aslında FOXL2'nin intragenik mutasyonlarının in vitro fonksiyonel analizleri POY'un (BPES Tip 1) FOXL2'nin transkripsiyonel kaybı ile ilişkili olduğunu öne sürmektedir. İnsanda FOXL2 tek doz yetmezliğinden dolayı farelerdeki fenotipin daha hafif formuna neden olduğu gözlemlenmiştir.

FOXL2 geni östrojen üretimi için birçok genin regülasyonunda rol almaktadır. Memeliler üzerinde yapılan birçok çalışmada CYP19A1 geninin ekspresyonunu aktive ettiği gösterilmiştir (168,171,172). Fare üzerinde yapılan bazı çalışmalarda FOXL2'nin CYP19A1 üzerinde represör etkisinin olabileceği bildirilmiş ancak bu farklı bulgu ile ilgili herhangi bir açıklama yapılamamıştır (173,174). FOXL2 aynı zamanda diğer steroidogenez ile alakalı enzimlerin regülasyonunda da rol almaktadır. Bunlardan ilki intramitokondriyal kolesterol transportunda rol alan StAR enzimidir. İnsan hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda FOXL2'nin StAR üzerindeki represif etkisi gösterilmiştir (175). FOXL2'nin aynı zamanda teka hücrelerinde androjen sentezinden sorumlu CYP17A1'i de represe ettiği gösterilmiştir. FOXL2, SF1 üzerinde supresör olarak rol oynamaktadır. Yaban tip FOXL2'nin SF1'in CYP17A1'in promoteri ile etkileşimini inhibe ettiğini, mutant FOXL2 durumunda ise bu inhibisyonun ortadan kalktığı bildirilmiştir (176). FOXL2 bununla birlikte geç folikülogenez döneminde de rol oynamaktadır. Örneğin granüloza hücreli tümörden derive hücrelerde FOXL2'nin over ekspresyonu prostaglandin sentaz üretiminin indüklenmesine neden olmaktadır. Ek olarak fare over transkriptom çalışmalarında *Serpine2*, *Has2*, *Ptger2* ve *Ednra* gibi ovulasyonda rol alan genlerin ekspresyonunun regülasyonunda rol aldığı gösterilmiştir (177). Yapılan çalışmalar FOXL2'nin preovulatuvar folikülün GH'lerinin normal transkripsiyonel programının devamında gerekli bir faktör olduğunu göstermiştir.

Bununla beraber geç folikülogenez döneminde FOXL2'nin rolü ile ilgili in vivo yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

GnRH FSH sentezinde kritik regülatör rol oynamaktadır. Yapılan mikroarray analizinde FOXL2'nin GnRHR'nin regülasyonunda rol aldığı gösterilmiştir. Granüloza hücre hattında FOXL2'nin ekspresyonundaki artışın GnRHR aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (178). FOXL2 overde GH'leri üzerindeki direkt etkisinin yanında hipofizdeki ekspresyonu aracılığı ile de folikülogenezde rol oynar. Gonadotrop hücrelerde FSH üretimi için FOXL2'nin gerekli olduğu gösterilmiştir. FOXL2 SMAD3 ile birlikte FSH üretiminde rol almaktadır. FOXL2 ve SMAD3 kooperasyonu FSH geninin promoteri üzerinde gözlemlenmiştir. Knockout *Foxl2* farelerde FSH üretiminde bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (179). Bu bilgiler SMAD3'ün FOXL2'nin anahtar partneri olduğunu düşündürmektedir.

Granüloza hücreli tümör (GHT), overin az rastlanılan, seks kordunun stromal kaynaklı tümörüdür. GHT tüm over kanserlerinin yaklaşık % 5'ini oluşturur. Juvenil ve yetişkin olarak iki tipi vardır. Overin yetişkin tip granüloza hücreli tümörlerinin % 97'sinde *FOXL2* c.402 C>G (p.C134W) gösterilmiştir (180). *FOXL2*'nin ekspresyonundaki artışın *TNF-RI*, *FAS* ve *TRAIL-R* gibi proapoptotik genleri aktive ettiği gösterilmiştir (181). FOXL2 aynı zamanda proapoptotik bir gen olan *DDX20* ile etkileşmektedir. Bu gen FOXL2 ile etkileşimi sonucu hücre ölümünü potansiyelize etmektedir. DDX20 SF1'e de bağlanmaktadır. DDX20 SF1'in transkripsiyonel aktivitesini represe etmektedir. Bu üç faktörün, birbirleri ile etkileşimleri bunların overde kompleks bir mekanizmanın komponentleri olduğunu düşündürmektedir (173). FOXL2'in aynı zamanda antiproliferatif rolünün bulunduğu ve bunu hücre siklus inhibitörü CDKN2A'yı aktive ve siklin D2'yi inhibe ederek yaptığı gösterilmiştir (182,183). FOXL2 oksidatif stres cevabında da, *SIRT1* ve *SOD2* gibi genlerin promoterine bağlanarak bu genlerin ekspresyonunu regüle ederek rol almaktadır (184). Folikülogenezin çeşitli aşamalarında *FOXL2* tarafından gerçekleştirilen fonksiyonlar Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.7.** Folikülogenez boyunca *FOXL2*'nin rolü. Georges ve ark. 2014'ten değiştirilerek alınmıştır (41).

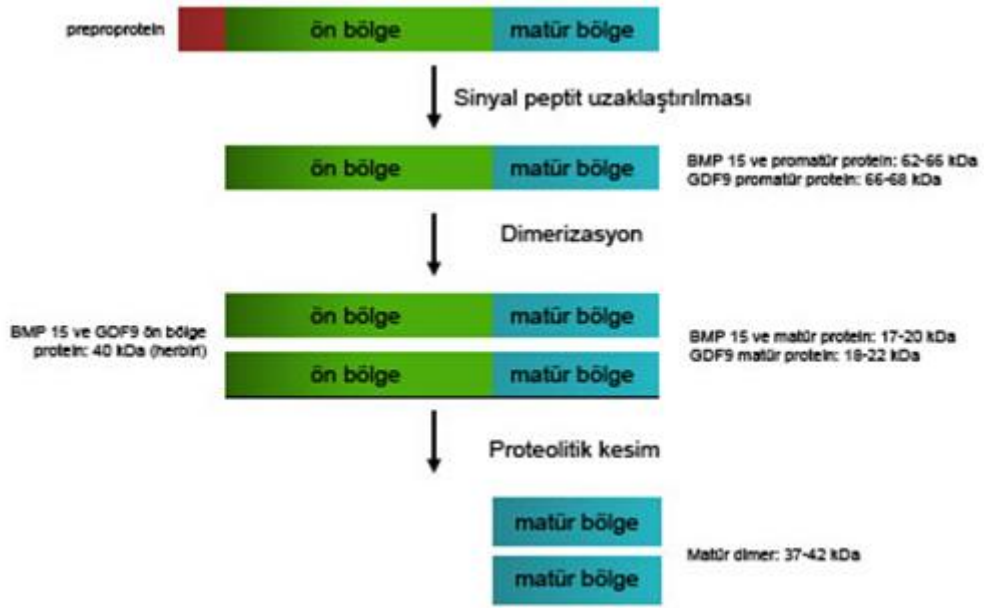
### 2.8.3. *FOXL2* Ekspresyonunun Regülasyonu

*FOXL2* ekspresyonu GATA4–FOG2 kompleksi ve  $\beta$  katenin yolağı için gereklidir. Bununla birlikte *FOXL2* geninin ekspresyonun düzenlenmesinde birçok faktör rol oynamaktadır. Öncelikle *FOXL2* kendi promoterine bağlanarak kendi ekspresyonunu düzenlemektedir (185). Diğer bir faktör retinoblastoma 1 (RB1)'dir. Farede yapılan çalışmalarda *Rb1* mutant farelerde massif foliküler atrezi ve erken over rezerv kaybı gözlenmektedir. Ayrıca RB1 ile ilişkili transkripsiyon faktörü olan ELF1, E2F1 ve E2F6'nın *FOXL2*'nin proksimal promoterine bağlandığı gösterilmiştir. Yapılan son çalışmalarda miR17 ve miR133b'nin *FOXL2* ekspresyonu üzerindeki etkisi gösterilmiştir (41).

*FOXL2*'nin posttranslasyonel modifikasyonunda serin 33 başta olmak üzere serin 211 veya tirozin 215, serin 28 ve serin 323 veya 326 fosforillenmektedir. Lizin 96, 114, 366'dan da asetillenmektedir. *FOXL2* fosforillenmesi LATS1 kinaz tarafından olmaktadır. Farede yapılan çalışmalarda *Lats1* mutant farelerde antral foliküllerin tamamına yakınının kaybı gözlenmiştir. *FOXL2* ayrıca sumolizasyona uğramaktadır ve SUMO ligaz PIAS1 ve UBC9 ile direkt etkileşime geçebilmektedir. Bu durumun *FOXL2*'nin stabilizasyonunu ve transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı gözlemlenmiştir (41). *FOXL2* aynı zamanda BANF1, DNA tamir proteini XRCC6 ve histon deasetilaz SIRT1 ile etkileşime geçerek kromatin regülasyonunda da rol oynamaktadır (186).

## 2.9. BMP15 Geni (GDF-9B)

Bu gen aynı zamanda *GDF-9B* olarak da bilinmektedir. *BMP15* Xp11.2’de lokalizedir (187,188). *BMP15* *TGF- $\beta$*  ailesine bağlı extraselüler sinyal proteinidir. İki ekzonu vardır. İlk ekzon 17, ikinci ekzon 125 aa kodlamaktadır.

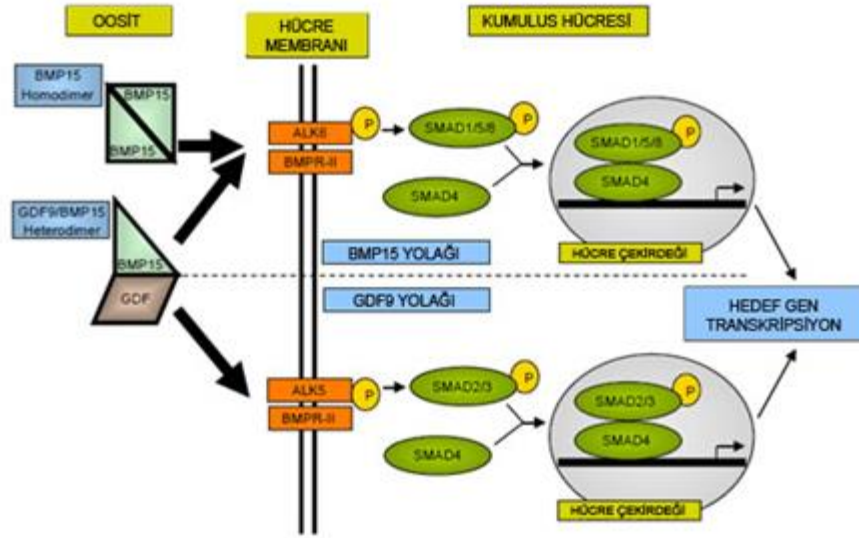


**Şekil 2.8.** BMP15 protein yapısı. Mester ve ark. 2013’ten değiştirilerek alınmıştır (189).

BMP15 diğer *TGF- $\beta$*  ailesi üyeleri gibi preproprotein olarak eksprese edilir. Bu protein sinyal peptidi, ön bölge (proregion) ve matür bölgeden (mature region) oluşur. Sinyal peptidin uzaklaştırılmasından sonra proprotein diğer bir *TGF $\beta$*  ailesinin bir üyesi ile dimerize olur. Daha sonra korunmuş RXXR bölgesinden kesime uğrarlar böylece biyoaktif matür bölge ön bölgeden ayrılmış olur (Şekil 2.8) (190). *TGF $\beta$*  ailesi üyelerinin çoğunun karakteristik bir özelliği matür bölgede korunmuş 7 sistein rezidüsünün varlığıdır. 4. sistein kovalent bağ ile dimer oluşturan subunitler arasındaki disülfid bağının oluşumunda rol oynamaktadır. BMP15’te bu 4. sistein serinle yer değiştirmiştir ve non kovalent bağlanmaya neden olmaktadır (190).

### 2.9.1. BMP15 ve Sinyal İletimi

BMP15 SMAD üzerinden iki farklı şekilde sinyal iletimine neden olur. Ya tip 1 reseptöre-ALK, ya da tip 2 reseptöre bağlanır. Her iki (ALK6-BMPRII) bağlanma sonucunda da reseptör ve SMAD'lar fosforillenmiş olur. BMP15 homodimeri BMP yolağını kullanır, bu yolak SMAD 1/5/8 üzerinden aktivasyon gösterir. Fosforile olan SMAD 1/5/8 SMAD 4 ile birlikte hedef gen ekspresyonu için nükleusa geçerler (Şekil 2.9) (190).



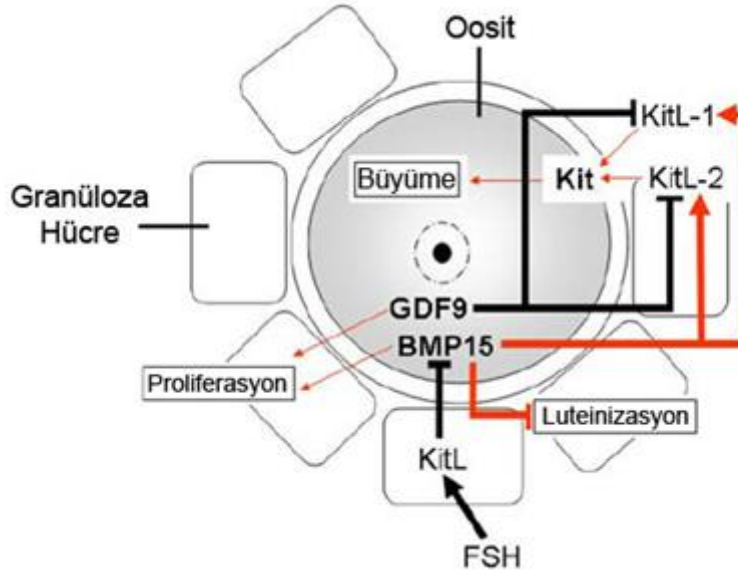
**Şekil 2.9.** Oosit-kumulus hücre sinyal yolağı. Marsh ve ark. 2011'den değiştirilerek alınmıştır (191).

BMP15-GDF9 heterodimeri ise SMAD 2/3 üzerinden aktivasyon gösterir. Fosforile olan SMAD 2/3 SMAD 4 ile etkileşerek hedef gen ekspresyonu için nükleusa geçerler. BMP15'in ana yolağı SMAD üzerinden olmasına rağmen, non-SMAD yolağı (nuclear factor kB, p38MAPK, SRC kinaz) üzerinden de etkisini gösterebilmektedir.

### 2.9.2. *BMP15* ve Fonksiyonları

*BMP15* oositlerde eksprese edilmektedir. İlk olarak primer folikülde eksprese edilen bu gen granüloza hücre proliferasyonunu stimüle etmektedir. Bu etkisini FSH'dan bağımsız yapmaktadır (44). Yapılan çalışmalarda *BMP15*'in FSH reseptör ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (44). *BMP15*'in bu etkisini FST antagonize etmektedir (192). *BMP15* folikül gelişimi sırasında oluşabilecek prematür luteinizasyonda da görev almaktadır. *BMP6* ve *GDF9* ile beraber FSH tarafından indüklenen progesteron üretimini inhibe etmektedir. Oluşabilecek erken bir luteinizasyon bu şekilde inhibe edilmektedir (192). *BMP15* aynı zamanda FSH'nın indüklediği StAR, P450 yan zincir kesim enzimi (side chain cleavage enzyme [P450scc]), 3 $\beta$ -HSD, LH reseptör ve inhibin/aktivin subunitlerinin de inhibisyonuna neden olmaktadır (190).

*BMP15* aynı zamanda *GDF9* geni ile eş zamanlı ekspresyon paternine sahiptir (193). İnsanda *GDF9*-*BMP15* heterodimerinin *BMP15* homodimerinden 1000 ile 3000 kat daha biyoaktif olduğu saptanmıştır. *BMP15* ve *GDF9*'un literatürde folikül yaşam süresi üzerine pozitif etkisi olduğu gösterilmiştir (194). *BMP15* mutasyonlarının insan ve koyunda POY'a neden olduğu gösterilmiştir (195,196). *BMP15* ve *GDF9*, KITL ile etkileşmektedir. *GDF9* KITL inhibisyonu yaparken, *BMP15* folikül gelişimi için gerekli olan granüloza hücre KITL ekspresyonunu uyarmaktadır. Uyarılan KITL ise negatif feed back yoluyla *BMP15*'i baskılamaktadır. FSH'nın indirekt olarak KITL üzerinden *BMP15* ekspresyonunun regülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Şekil 2.10).



**Şekil 2.10.** Oosit folikül gelişiminde KITL BMP15 etkileşimi. Marsh ve ark. 2011'den değiştirilerek alınmıştır (191).

BMP15 kumulus hücre apoptozunu engellemektedir. Sığır (Bovine) üzerinde yapılan çalışmalar göstermektedir ki oosit, kumulus oosit kompleksinden ayrıldıktan sonra kumulus hücre apoptozu indüklenmiş olur. BMP15 eklenen kumulus hücreleri bu apoptozdan korunmuşlardır. Bundan dolayı oositin kompleksten ayrılmasına kadar ki süreçte BMP15'in bu apoptozu önlediği düşünülmektedir (197). BMP15 aynı zamanda kumulus ekspansiyonunu sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda oositin kompleksten ayrılması ile fare kumulus hücrelerinde *Egfr* ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Gdf9 ve Bmp15 ile müdahale edilen kumulus hücrelerinde *Egfr* ekspresyonunda tekrar düzelme olmuştur. Yapılan çalışmalar GDF9 ve BMP15'in kumulus hücre ekspansiyonunda anahtar rol oynadığını göstermektedir (198).

BMP15 yardımcı üreme tekniklerinin uygulanması sırasında da bazı etkilere neden olmaktadır. *BMP15* geninde mutasyon varlığının FSH tedavisine aşırı yanıtın indüklediği over hiperstimülasyon sendromu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (199). Intrastoplazmik sperm enjeksiyonu planlanan kadınlarda foliküler sıvıda yüksek BMP15 oranının yüksek fertilizasyon oranı ve embriyo gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (200).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma Grubu

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Genetik Bölümüne POY nedeniyle başvuran hastalar incelenmiştir. Çalışma için Ankara Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul kararı alınmış (EK 1) ve hastalar bilgilendirilmiş gönüllü oluru (EK 2) alındıktan sonra araştırmaya dahil edilmiştir.

##### 3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

- 1) 40 yaş altında olma
- 2) Serum FSH>40 IU/lt
- 3) Primer veya sekonder amenore
- 4) Normal karyotip: 46,XX
- 5) Negatif *FMRI* gen mutasyonu

##### 3.1.2. Dışlama Kriterleri

- 1) Overkistektomi veya ooferektomi öyküsü varlığı
- 2) Pelvik kemoterapi öyküsü
- 3) Pelvik radyasyona maruziyet öyküsü
- 4) Endokrin veya otoimmün hastalık öyküsü
- 5) Ovaryan cerrahi operasyon öyküsü

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Periferik Kandan Lenfosit Hücre Kültürü

**Besiyerinin Hazırlanışı:** Besiyeri içeriği Tablo 3.1’de gösterilmiştir (inaktif hale

gelmesi için *fetal bovine serum* 65 °C’de 30 dk inkübe edilmiştir). Hazırlanan besiyeri 5 ml’lik alikotlara ayrılmış ve -20 °C’de bekletilmiştir.

**Tablo 3.1.** Besiyeri İçeriği.

| Besiyeri İçeriği                                                                              | Hacim (ml) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>RPMI-1640-Medium</i><br>(Cat No: 350-000-CL)                                               | 100        |
| <i>FETAL BOVINE SERUM</i><br>(Cat No: 1418110, Multicell)                                     | 20         |
| <i>Phytohemagglutinin M</i><br>(Cat No: 1433274, Multicell)                                   | 2.5        |
| L-Glutamin (200 mM)<br>(Cat No: 1307862)                                                      | 1          |
| Antibiyotik solüsyonu:<br>10.000U/ml Penicilline G (İE), 10 µg/ml<br>Streptomisin Sulfat (İE) | 1          |

**Hipotonik Solüsyonunun Hazırlanması:** 0.56 g KCl 100 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözülmüştür. Solüsyon 37 °C’de saklanmıştır (Solüsyonlar günlük hazırlanmıştır).

**Fiksatif Solüsyonunun Hazırlanması:** 25 ml asetik asit, 75 ml metanol ile karıştırılmış, solüsyon -20 °C’de saklanmıştır (Solüsyonlar günlük hazırlanmıştır).

**Sitogenetik Ekim ve Çıkarım Aşamaları:** 5 ml besiyeri içeren tüpe 0,8 ml heparinli periferik kan eklenmiştir. Tüpler etüvde 37 °C’de 72 saat inkübe edilmiştir. Çıkarımdan 1 saat önce 10 µg/ml’lik kolşisin 100 µl kolşisin (Cat No: C9754-16, Sigma-Aldrich) eklenmiştir. Kolşisin eklendikten 1 saat sonra tüpler 900 devirde 10 dk santrifüj edilmiş, süpernatantları uzaklaştırıldıktan sonra peletler homojenize edilmiştir.

Tüplere yeni hazırlanıp 37 °C’de bekletilen hipotonik solüsyonundan 5 ml eklenmiş ve 37 °C’de 40 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler 900 devirde 10 dk santrifüj edilmiş, süpernatantları uzaklaştırıldıktan sonra peletler homojenize

edilmiştir. Sonrasında tüpler 6 ml'ye kadar yeni hazırlanıp -20 °C'de bekletilen fiksatif solüsyonu ile doldurulmuştur. Son iki basamak 3 kez daha tekrarlanmış son basamakta tüpler +4 °C'ye kaldırılmıştır.

### 3.2.2. DNA İzolasyonu

Genomik DNA, EDTA'lı tüpe alınmış 1 ml periferik kandan, *Magna Pure LC Instrument (Roche Applied Science)* cihazı kullanılarak izole edilmiştir.

### 3.2.3. Fragman Analizi

Fragman analizinde Applied Biosystems® AmpliTaq Gold® 360 DNA Polymerase seti kullanılmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'nda kullanılan primer dizileri Tablo 3.2'de verilmiştir. Reverse primerin (R1) 5'ucu 6-FAM ile işaretlenmiştir.

**Tablo 3.2.** Fragman analizinde kullanılan primerler.

|           | <b>FRAJİL X</b>                |
|-----------|--------------------------------|
| <b>F1</b> | AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA |
| <b>R1</b> | CGACCTGTCACCGCCCTTCAGCCTTCC    |

Her örnek için Tablo 3.3'te gösterildiği şekilde master miks hazırlanmıştır. Karışımlar iyice vortekslenip 48 µl'si üzerine 2 µl (50 ng/µl) DNA örneği eklenmiştir.

**Tablo 3.3.** Fragman analizi PZR karışımının hazırlanışı.

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| 10XBuffer                    | 5,00µl |
| dNTP (5 mM)                  | 2,00µl |
| Enhancer Sol.                | 5,00µl |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)    | 4,00µl |
| Forward primer<br>(10 pm/µl) | 1,00µl |

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| Reverse primer (FAM)<br>(10 pm/μl) | 1,00μl  |
| dH <sub>2</sub> O                  | 25,00μl |
| Taq (5 U/μl)                       | 0,40μl  |
| DMSO                               | 4,60μl  |
| TOPLAM                             | 48,00μl |

|                |      |
|----------------|------|
| MİKS           | 48μl |
| DNA (50 ng/μl) | 2μl  |
| TOPLAM         | 50μl |

PZR Tablo 3.4’te verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir (35 siklus).

**Tablo 3.4.** Fragman analizi PZR koşulları.

|                  |         |       |
|------------------|---------|-------|
| İlk denatürasyon | 95 °C   | 4 dk  |
| Denatürasyon     | 95 °C   | 90 sn |
| Annealing        | 62 °C   | 90 sn |
| Extension        | 72 °C   | 90 sn |
| Son extension    | 68 °C   | 15 dk |
| Saklama          | + 10 °C | ∞     |

Elde edilen örnekler agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

#### 3.2.4. Agaroz Jel Elektrofrez

Bu amaçla 54 g *Trisbase*, 27,5 g Borik asit ve 20 ml 0,5 mM EDTA karıştırılıp dH<sub>2</sub>O ile 1 litreye tamamlanarak hazırlanan 5XTBE (Tris / Borik asit / EDTA), 1X TBE olacak şekilde distile su ile 1:4 oranında dilüe edilmiştir. % 2’lik jel hazırlanması için 60 ml 1 x TBE içine 1.2 g agaroz eklenmiştir. Çözelti mikrodalga fırında orta ayarda 3.5 dk ısıtılıp sonrasında içine 1.0 μl EtBr (Ethidium Bromide) (10 mg/ml) eklenerek karıştırılmıştır. Jel elektrofrez aparatına dökülerek soğumaya

bırakılmıştır. Elektroforez tankı (Cleaver Scientific Ltd.) 1 x TBE ile doldurularak jel yürütme işlemine hazır hale getirilmiştir. 10 µl PZR ürünü, 2 µl 6x yükleme tamponu (0,025 g bromfenol mavisi, 0,025 g ksilen siyanol ve 0,3 ml gliserol karıştırılıp dH<sub>2</sub>O ile 1 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır) ile karıştırılıp, karışımın 10 µl'si agaroz jele yüklenmiştir. 90 Volt (V)'ta 45 dk elektroforez uygulandıktan sonra jel *Kodak Gel 200* görüntüleme cihazında görüntülenerek *Kodak 1D Image Analysis Software (Rochester, New York)* kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen bantların boyları, *50 bp DNA Step Ladder (Catalog No: 00129017, Thermo Scientific)* kullanılarak kontrol edilmiştir.

### 3.2.5. Örneklerin Kapillere Yüklenmesi

1 µl PZR ürünü üzerine 9 µl Hi-Di formamide ve 0,5 µl ROX 1000 size standart (Gene Scan™-1000 ROX™ Size Standart Product P/N: 401098) eklenip vorteksle karıştırılmış ve 95 °C'de 3 dk bekletilip sonrasında soğutulması amacı ile 2 dk -20 °C'de bekletilmiştir. İşlem sonrası örnekler kapiller elektroforeze yüklenmiştir.

### 3.2.6. Analiz

GeneMapper™ Software kullanılarak değerlendirme yapılmıştır.

### 3.2.7. Dizi Analizi

Dizi analizi Invitrogen Platinum® Taq seti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *FOXL2* geninin tek ekzonu 3 farklı primer çifti kullanılarak ve *BMP15* genine ait iki ekzon da 3 farklı primer çifti kullanılarak, intron-ekzon birleşme (*junction*) bölgelerini de kapsayacak şekilde *GenePro* cihazında PZR ile çoğaltılmıştır (201,202). PZR'de kullanılan primerler, PZR ürünü uzunlukları, PZR karışımlarının içeriği ve PZR koşulları Tablo 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 ve 3.9'da verilmiştir.

**Tablo 3.5.** *FOXL2* ve *BMP15* genleri dizi analizinde kullanılan primer dizileri.

|           | <i>BMP15</i>              | <i>FOXL2</i>        |
|-----------|---------------------------|---------------------|
|           | <b>1.Kısım</b>            |                     |
| <b>F1</b> | AGTGACGTCCCTTGGGCTTG      | CAGCGCCTGGAGCGGAGAG |
| <b>R1</b> | CAAAGCCTGACAGTAAACCC      | CTTGCCGGGCTGGAAGTGC |
|           | <b>2. Kısım</b>           |                     |
| <b>F2</b> | GGGCTGATTATAGCTATCAGTC    | GACCCGGCCTGCGAAGACA |
| <b>R2</b> | GGAAGAGGCAGTAACCTCAGCTG   | GGCCGCGTGCAGATGGTGT |
|           | <b>3. Kısım</b>           |                     |
| <b>F3</b> | GGGAATCTCTTCTCCGGAGAACC   | CGCGGCCGCTGTGGTCAAG |
| <b>R3</b> | CTAGCTCACAAGTGGGGGAAGAGAC | GCTGGCGGCGGCGTCGTC  |

**Tablo 3.6.** Elde edilen PZR ürünü uzunlukları.

|                           | <i>FOXL2</i><br>1.Kısım | <i>FOXL2</i><br>2.Kısım | <i>FOXL2</i><br>3.Kısım | <i>BMP15</i><br>1.Kısım | <i>BMP15</i><br>2.Kısım | <i>BMP15</i><br>3.Kısım |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Ürün Uzunluğu (bp)</b> | 545                     | 517                     | 500                     | 477                     | 617                     | 555                     |

**Tablo 3.7.** *FOXL2* ve *BMP15* genleri için hazırlanan PZR karışımlarının içerikleri.

| <b>KİMYASAL</b>           | <i>FOXL2</i><br>1.KISIM | <i>FOXL2</i><br>2.KISIM | <i>FOXL2</i><br>3.KISIM | <i>BMP15</i><br>1.KISIM | <i>BMP15</i><br>2.KISIM | <i>BMP15</i><br>3.KISIM |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Buffer (10x)              | 5,00µl                  | 5,00µl                  | 5,00µl                  | 5,00µl                  | 5,00µl                  | 5,00µl                  |
| dNTP (5 mM)               | 2,00µl                  | 2,00µl                  | 2,00µl                  | 2,00µl                  | 2,00µl                  | 2,00µl                  |
| MgCl <sub>2</sub> (50 mM) | 1,00µl                  | 1,00µl                  | 1,50µl                  | 1,50µl                  | 1,50µl                  | 1,50µl                  |
| F (10 pm/µl)              | 4,00µl                  | 2,00µl                  | 2,00µl                  | 2,00µl                  | 2,00µl                  | 2,00µl                  |
| R (10 pm/µl)              | 4,00µl                  | 2,00µl                  | 2,00µl                  | 2,00µl                  | 2,00µl                  | 2,00µl                  |
| DNA (50 ng/µl)            | 2,00µl                  | 1,00µl                  | 1,00µl                  | 1,00µl                  | 1,00µl                  | 1,00µl                  |
| Taq (5 U/µl)              | 0,20µl                  | 0,20µl                  | 0,20µl                  | 0,20µl                  | 0,20µl                  | 0,20µl                  |
| DMSO                      | 0,00µl                  | 2,30µl                  | 4,60µl                  | 0,00µl                  | 0,00µl                  | 0,00µl                  |
| dH <sub>2</sub> O         | 31,80µl                 | 34,50µl                 | 31,70µl                 | 36,30µl                 | 36,30µl                 | 36,30µl                 |
| TOPLAM                    | 50,00µl                 | 50,00µl                 | 50,00µl                 | 50,00µl                 | 50,00µl                 | 50,00µl                 |

**Tablo 3.8.** *FOXL2* geni dizi analizi PZR koşulları.

|              |   | <b><i>FOXL2-1</i></b> |              | <b><i>FOXL2-2</i></b> |              | <b><i>FOXL2-3</i></b> |              |
|--------------|---|-----------------------|--------------|-----------------------|--------------|-----------------------|--------------|
|              |   | Sıcaklık<br>[°C]      | Süre<br>[dk] | Sıcaklık<br>[°C]      | Süre<br>[dk] | Sıcaklık<br>[°C]      | Süre<br>[dk] |
|              | 1 | 95                    | 4            | 95                    | 4            | 95                    | 4            |
| 40<br>siklus | 2 | 95                    | 1            | 95                    | 1            | 95                    | 1            |
|              | 3 | 68                    | 1            | 68                    | 1            | 64                    | 1            |
|              | 4 | 72                    | 1            | 72                    | 1            | 72                    | 1            |
|              | 5 | 72                    | 7            | 72                    | 7            | 72                    | 7            |

**Tablo 3.9.** *BMP15* geni dizi analizi PZR koşulları.

|              |   | <b><i>BMP15-1</i></b> |              | <b><i>BMP15-2</i></b> |              | <b><i>BMP15-3</i></b> |              |
|--------------|---|-----------------------|--------------|-----------------------|--------------|-----------------------|--------------|
|              |   | Sıcaklık<br>[°C]      | Süre<br>[dk] | Sıcaklık<br>[°C]      | Süre<br>[dk] | Sıcaklık<br>[°C]      | Süre<br>[dk] |
|              | 1 | 95                    | 4            | 95                    | 4            | 95                    | 4            |
| 40<br>siklus | 2 | 95                    | 1            | 95                    | 1            | 95                    | 1            |
|              | 3 | 60                    | 1            | 60                    | 1            | 68                    | 1            |
|              | 4 | 72                    | 1            | 72                    | 1            | 72                    | 1            |
|              | 5 | 72                    | 7            | 72                    | 7            | 72                    | 7            |

Elde edilen PZR ürünlerinin 10 µl'si agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir.

Sonrasında 5 µl PZR ürünü, 2 µl ExoSAP-IT reaktifiyle karıştırılmış ve karışım 37 °C'de 15 dk, 80 °C'de 15 dk inkübe edilerek temizleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Her bir temizlenmiş PZR ürünü için *forward* ve *reverse* primerlerle iki yönlü dizi analizi PZR'si gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi PZR karışımı ve reaksiyon koşulları sırasıyla Tablo 3.10'da gösterilmiştir.

**Tablo 3.10.** *FOXL2* ve *BMP15* genleri dizi analizi PZR karışımı içerikleri ve koşulları.

|                                                                              |        |       |
|------------------------------------------------------------------------------|--------|-------|
| ABI Prism ® Bigdye™ Terminator<br>(Product P/N: 4336917, Applied Biosystems) |        | 1 µl  |
| Sulandırma Solüsyonu (Half)                                                  |        | 1 µl  |
| PZR ürünü                                                                    |        | 2 µl  |
| Primer (forward veya reverse)(1 pmol/µl)                                     |        | 2 µl  |
| ABI Prism ® Bigdye™ Buffer (Applied Biosystems)                              |        | 2 µl  |
| dH <sub>2</sub> O                                                            |        | 2 µl  |
| Toplam hacim                                                                 |        | 10 µl |
| Denatürasyon                                                                 | 96 °C  | 1 dk  |
| Amplifikasyon<br>(25 döngü)                                                  | 95 °C  | 10 sn |
|                                                                              | 50 °C  | 5 sn  |
|                                                                              | 50 °C  | 4 dk  |
|                                                                              | + 4 °C | ∞     |

Dizi analizi reaksiyon ürünlerini saflaştırmak için Sephadex G-50 Medium (Sigma-Aldrich) kiti kullanılmıştır. 13 ml steril distile suya 1 g sephadex medium eklenerek karıştırılmıştır. Yeni hazırlanan sephadex, ilk kullanımdan önce 30 dk bekletilmiş, sonrası kullanımlar için +4 °C’de saklanmıştır. Dizi analizi reaksiyon ürünlerinin temizlenmesi için spin kolonlara 750 µl sephadex aktararak 5200 rpm’de 2 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra spin kolonlar temiz ve numaralandırılmış yeni tüplere yerleştirilip, 10 µl reaksiyon ürünü spin kolonlardaki sephadex orta kısmına aktarılmış ve 5200 rpm’de 2 dk santrifüj edilerek temizleme işlemi tamamlanmıştır.

Ürünler 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) cihazına yüklenerek kapiller elektroforez gerçekleştirilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi için SeqScape version 2.7 (Applied Biosystems) ve Sequencing Analysis version 5.1 (Applied Biosystems) Windows 7 (Microsoft) yazılımları kullanılmıştır.

#### 4. BULGULAR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine POY ön tanısı ile başvuran 54 ve Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Genetik Bölümü polikliniğine başvuran 25 olmak üzere toplam 79 hasta çalışmaya alınmıştır. Olgu 4 ve olgu 34'ün anne-kız, olgu 20, olgu 46 ve olgu 69, olgu 70, olgu 71'in kardeş oldukları öğrenilmiştir. Olgulara ait özellikler Tablo 4.1'de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Tüm hastaların tanı yaşı, tanısı ve hormonal değerleri. (PA: Primer amenore, SA: Sekonder amenore)

| No      | Yaş | Tanı | FSH<br>(mIU/ml) | LH<br>(mIU/ml) | E2<br>(pg/ml) |
|---------|-----|------|-----------------|----------------|---------------|
| Olgu 1  | 24  | SA   | 54              | 12             |               |
| Olgu 2  | 24  | SA   | 115             | 66             | <20           |
| Olgu 3  | 32  | SA   | 75              | 25             | 62            |
| Olgu 4  | 23  | PA   | 102             | 51             | <20           |
| Olgu 5  | 38  | SA   | 60              | 32             | <20           |
| Olgu 6  | 35  | SA   | 48              |                |               |
| Olgu 7  | 29  | SA   | 95              | 74             | 11            |
| Olgu 8  | 38  | SA   | 182             | 50             | <20           |
| Olgu 9  | 18  | PA   | 68              | 16             | <20           |
| Olgu 10 | 39  | SA   | 49              | 18             | <20           |
| Olgu 11 | 33  | SA   | 45              | 16             | 22            |
| Olgu 12 | 31  | SA   | 42              | 22             | <20           |
| Olgu 13 | 29  | SA   | 48              | 20             | <20           |
| Olgu 14 | 33  | SA   | 121             | 49             | 34            |
| Olgu 15 | 32  | SA   | 48              | 11             | <20           |
| Olgu 16 | 39  | SA   | 66              | 27             | 32            |
| Olgu 17 | 32  | SA   | 177             | 13             | 10            |
| Olgu 18 | 39  | SA   | 63              | 37             | <20           |
| Olgu 19 | 28  | SA   | 60              | 17             | 25            |
| Olgu 20 | 11  | PA   | 68              | 14             | <20           |
| Olgu 21 | 24  | SA   | 75              | 17             | <11           |

**Tablo 4.1.** (devam)

| <b>Yaş</b> | <b>Tamı</b> | <b>FSH<br/>(mIU/ml)</b> | <b>LH<br/>(mIU/ml)</b> | <b>E2<br/>(pg/ml)</b> | <b>No</b> |
|------------|-------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|-----------|
| Olgu 22    | 35          | SA                      | 106                    | 37                    |           |
| Olgu 23    | 25          | SA                      | 53                     | 15                    | 28        |
| Olgu 24    | 34          | PA                      | 48                     | 25                    | 6         |
| Olgu 25    | 29          | SA                      | 52                     | 19                    | 5         |
| Olgu 26    | 29          | PA                      | 83                     | 29                    | <20       |
| Olgu 27    | 33          | SA                      | 90                     | 28                    | 21        |
| Olgu 28    | 39          | SA                      | 54                     | 21                    | <20       |
| Olgu 29    | 26          | PA                      | 57                     | 16                    | <20       |
| Olgu 30    | 36          | SA                      | 73                     | 29                    | 48        |
| Olgu 31    | 22          | SA                      | 94                     | 48                    | <20       |
| Olgu 32    | 28          | SA                      | 103                    | 34                    | 33        |
| Olgu 33    | 32          | SA                      | 88                     | 49                    | <20       |
| Olgu 34    | 38          | SA                      | 102                    | 51                    | <20       |
| Olgu 35    | 27          | SA                      | 99                     | 46                    | 34        |
| Olgu 36    | 37          | SA                      | 42                     | 13                    | <20       |
| Olgu 37    | 28          | SA                      | 111                    | 49                    | 21        |
| Olgu 38    | 38          | SA                      | 66                     |                       | 35        |
| Olgu 39    | 30          | SA                      | 41                     | 15                    | <20       |
| Olgu 40    | 39          | SA                      | 45                     | 7                     | <20       |
| Olgu 41    | 39          | SA                      | 44                     | 31                    | <20       |
| Olgu 42    | 38          | SA                      | 130                    | 56                    | <20       |
| Olgu 43    | 19          | SA                      | 52                     | 45                    | 42        |
| Olgu 44    | 26          | SA                      | 41                     | 5                     | 35        |
| Olgu 45    | 25          | SA                      | 88                     | 37                    | 21        |
| Olgu 46    | 14          | PA                      | 126                    | 47                    | <20       |
| Olgu 47    | 29          | SA                      | 62                     | 55                    | 128       |
| Olgu 48    | 31          | SA                      | 40                     | 17                    | <20       |
| Olgu 49    | 29          | PA                      | 40                     | 23                    | 25        |
| Olgu 50    | 39          | SA                      | 116                    | 41                    | <20       |
| Olgu 51    | 25          | SA                      | 40                     | 11                    | <20       |
| Olgu 52    | 30          | SA                      | 46                     | 13                    | <20       |
| Olgu 53    | 26          | SA                      | 40                     | 12                    | <11,8     |

**Tablo 4.1. (devam)**

| No      | Yaş | Tanı | FSH<br>(mIU/ml) | LH<br>(mIU/ml) | E2<br>(pg/ml) |
|---------|-----|------|-----------------|----------------|---------------|
| Olgu 54 | 32  | SA   | 71              | 28             | <20           |
| Olgu 55 | 18  | PA   | 61              | 15             | <11,8         |
| Olgu 56 | 15  | SA   | 94              | 48             | 17            |
| Olgu 57 | 22  | PA   | 57              | 35             | 60            |
| Olgu 58 | 38  | SA   | 48              | 21             | 64            |
| Olgu 59 | 39  | SA   | 74              | 55             | 42            |
| Olgu 60 | 20  | SA   | 75              | 30             | 26            |
| Olgu 61 | 23  | SA   | 87              | 29             | <20           |
| Olgu 62 | 19  | SA   | 67              | 41             | <20           |
| Olgu 63 | 26  | SA   | 45              | 25             | 31            |
| Olgu 64 | 37  | SA   | 40              |                |               |
| Olgu 65 | 38  | SA   | 45              |                |               |
| Olgu 66 | 17  | PA   | 101             | 30             | 16            |
| Olgu 67 | 39  | PA   | 46              | 38             | <20           |
| Olgu 68 | 33  | SA   | 81              | 36             | <20           |
| Olgu 69 | 28  | SA   | 100             | 55             | 33            |
| Olgu 70 | 29  | SA   | 78              | 39             | <20           |
| Olgu 71 | 25  | SA   | 92              | 57             | <20           |
| Olgu 72 | 29  | SA   | 85              | 10             | 19            |
| Olgu 73 | 21  | SA   | 70              | 47             | 12            |
| Olgu 74 | 28  | SA   | 47              | 19             | 19            |
| Olgu 75 | 39  | PA   | 81              | 39             | <20           |
| Olgu 76 | 33  | SA   | 46              | 27             | <20           |
| Olgu 77 | 28  | SA   | 49              | 32             | 87            |
| Olgu 78 | 29  | SA   | 65              | 8              | 10            |
| Olgu 79 | 25  | SA   | 62              | 32             | 48            |

Olguların tanı yaşları 11 yaş ile 39 yaş arasında değişmektedir. Hastaların ortalama tanı yaşı  $29.56 \pm 6.97$  olarak saptanmıştır. 13 olgu (% 16.46) primer amenore tanısı, 66 olgu (% 83.54) sekonder amenore tanısı ile çalışmaya dahil edilmiştir. Yapılan

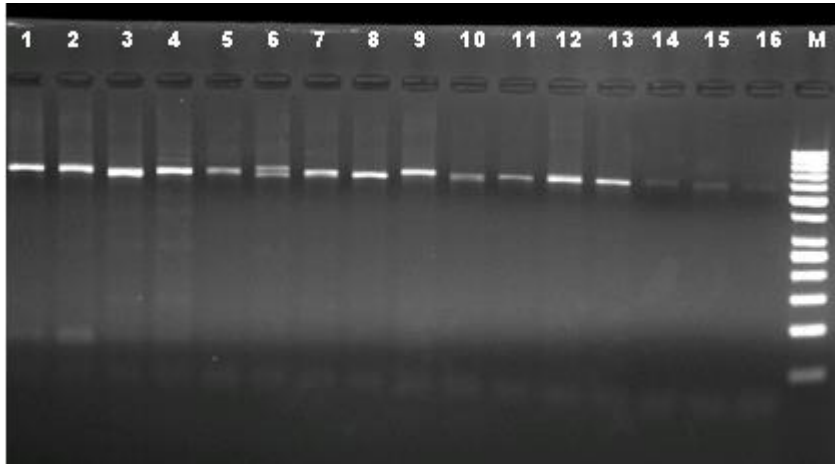
hormonal analiz sonucunda ortalama FSH düzeyi  $72.15 \pm 29.76$  mIU/ml, ortalama LH düzeyi  $30.76 \pm 15.77$  mIU/ml olarak saptanmıştır.

#### 4.1. Kromozom Analizi

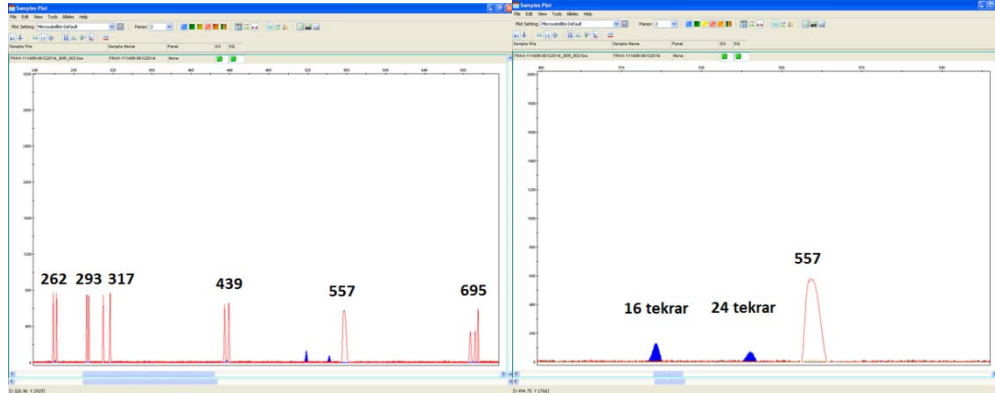
Periferik kandan hazırlanan 72 saatlik lenfosit kültüründe toplam 20 metafaz değerlendirilerek kromozom analizi gerçekleştirilmiştir.

#### 4.2. Fragman Analizi

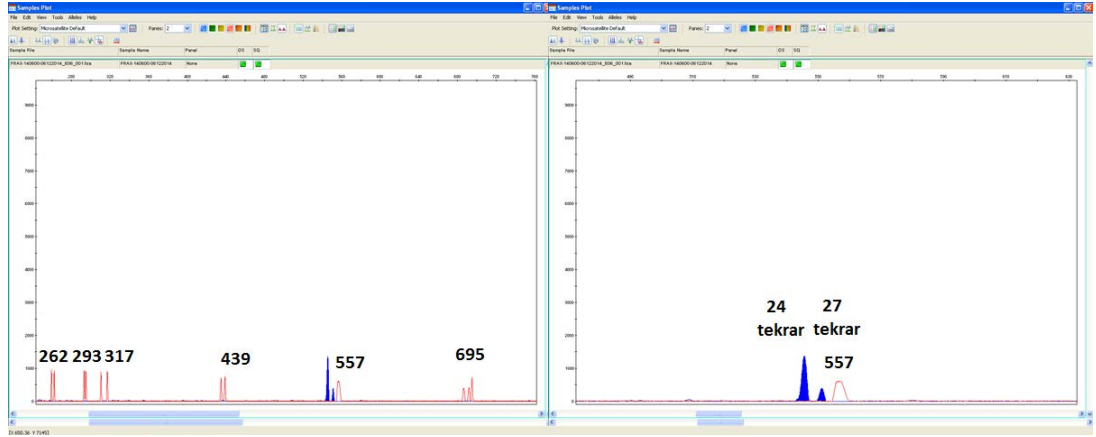
Yapılan fragman analizi sonucunda hastalarda *Fragil X* geni tekrar sayıları normal sınırlar arasında bulunmuştur. Bazı olgulara ait fragman analizi PZR ürünlerinin agaroz jel ve kapiller elektroforez görüntüleri Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.



**Şekil 4.1.** 1-16 nolu kuyular: 41, 40, 39, 50, 26, 49, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 47, 46 ve 45 nolu olgulara ait fragman analizi PZR ürünleri, M: Marker; 50 bç ladder.



**Şekil 4.2.** Fragman analizi yapılan olgu 46'ya ait (Şekil 4.1'deki-15. kuyu) kapiller elektroforez görüntüsü.



**Şekil 4.3.** Fragman analizi yapılan olgu 50'ye ait (Şekil 4.1'deki-4. kuyu) kapiller elektroforez görüntüsü.

### 4.3. Dizi Analizi

*BMP15* geni:

Çalışmamızda 79 olgunun 38'inde (% 48) *BMP15* geninde değişiklik saptanmıştır. 79 olgunun 23'ünde c.-9 C>G, 14'ünde c.-9 C>G ve c.308 A>G, 1 olguda da c.-9 C>G ve c.352 G>A değişikliği saptanmıştır. 38 olguda saptanan c.-9 C>G değişikliğinin 35'i heterozigot olarak bulunmuştur. Olgu 6, olgu 20 ve olgu 46'da c.-9 C>G değişikliği homozigot mutant olarak saptanmıştır. *BMP15* geninde bulunan değişiklikler Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.** *BMP15* geninde bulunan değişiklikler.

| <b>Olgu No</b> | <b>BMP15 Geni</b>     | <b>Olgu No</b> | <b>BMP15 Geni</b>     |
|----------------|-----------------------|----------------|-----------------------|
| Olgu 1         | c.-9 C>G              | Olgu 46        | c.-9 C>G              |
| Olgu 6         | c.-9 C>G<br>c.308 A>G | Olgu 47        | c.-9 C>G<br>c.308 A>G |
| Olgu 8         | c.-9 C>G              | Olgu 48        | c.-9 C>G              |
| Olgu 10        | c.-9 C>G<br>c.308 A>G | Olgu 49        | c.-9 C>G<br>c.308 A>G |
| Olgu 12        | c.-9 C>G<br>c.308 A>G | Olgu 51        | c.-9 C>G<br>c.308 A>G |
| Olgu 13        | c.-9 C>G              | Olgu 55        | c.-9 C>G              |
| Olgu 18        | c.-9 C>G              | Olgu 57        | c.-9 C>G              |
| Olgu 20        | c.-9 C>G              | Olgu 60        | c.-9 C>G              |
| Olgu 24        | c.-9 C>G              | Olgu 61        | c.-9 C>G              |
| Olgu 28        | c.-9 C>G              | Olgu 62        | c.-9 C>G<br>c.308 A>G |
| Olgu 29        | c.-9 C>G<br>c.308 A>G | Olgu 63        | c.-9 C>G              |
| Olgu 32        | c.-9 C>G<br>c.308 A>G | Olgu 68        | c.-9 C>G              |
| Olgu 34        | c.-9 C>G              | Olgu 69        | c.-9 C>G<br>c.308 A>G |
| Olgu 35        | c.-9 C>G              | Olgu 70        | c.-9 C>G<br>c.308 A>G |
| Olgu 39        | c.-9 C>G              | Olgu 72        | c.-9 C>G              |
| Olgu 40        | c.-9 C>G              | Olgu 73        | c.-9 C>G              |
| Olgu 41        | c.-9 C>G<br>c.308 A>G | Olgu 74        | c.-9 C>G              |
| Olgu 42        | c.-9 C>G<br>c.308 A>G | Olgu 76        | c.-9 C>G              |
| Olgu 45        | c.-9 C>G<br>c.308 A>G | Olgu 77        | c.-9 C>G<br>c.352 G>A |

*BMP15* geninde saptanan c.-9 C>G değişikliğinin toplumdaki sıklığını saptamak amacıyla 80 kadından oluşan kontrol grubu çalışılmıştır. Yapılan incelemede 15 kadında c.-9 C>G değişikliği heterozigot, 9 kadında c.-9 C>G değişikliği homozigot

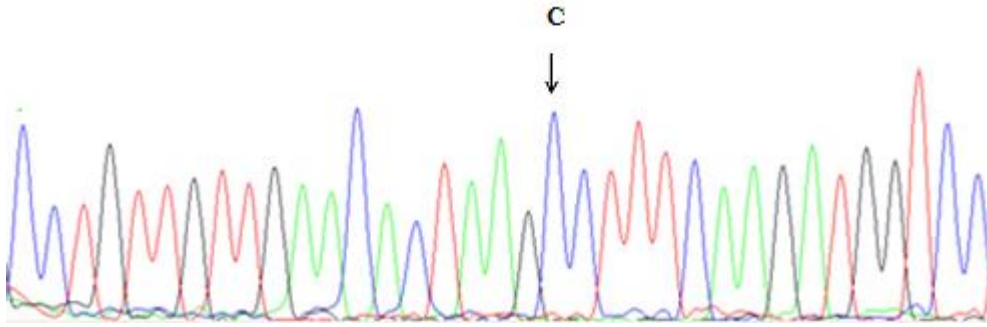
olarak saptanmıştır. *BMP15* c.-9 C>G genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.** Hasta ve kontrol grubunda *BMP15* c.-9 C>G genotiplerinin dağılımı.

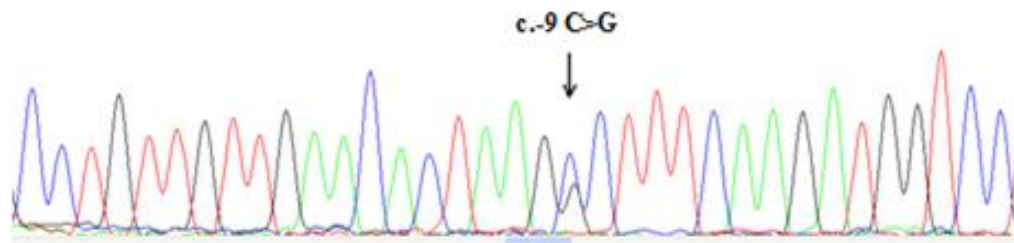
|             | C/C        | C/G        | G/G       | Toplam |
|-------------|------------|------------|-----------|--------|
| Hasta grubu | 41 (%51.9) | 35 (%44.3) | 3 (%3.8)  | 79     |
| Kontrol     | 56 (%70)   | 15 (%18.8) | 9 (%11.2) | 80     |
| Toplam      | 97(%61.0)  | 50(%31.4)  | 12 (%7.6) | 159    |

Yapılan istatistiksel incelemede CG heterozigot bireylerin sayısının kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ( $p<0.05$ ).

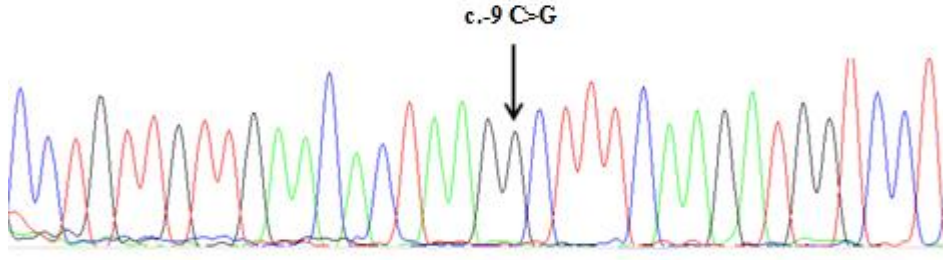
**c.-9 C>G (rs3810682):** 5' UTR bölgesinde bulunmaktadır. Yapılan in vitro fonksiyonel bir çalışmada genin anlamlı derecede ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6) (203).



**Şekil 4.4.** *BMP15* geni c.-9 C>G homozigot normal saptanan olgu 11'e ait dizi analizi görüntüsü.

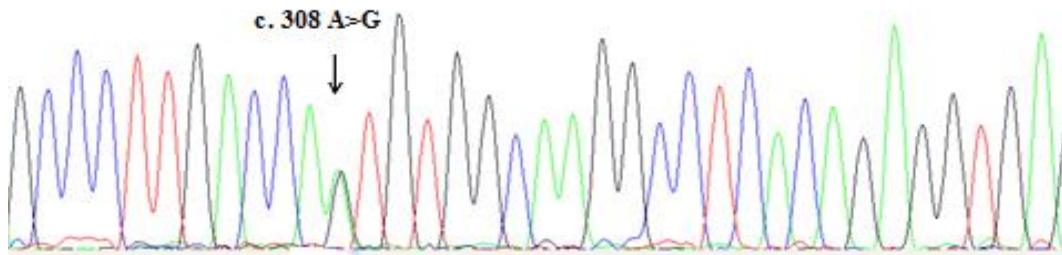


**Şekil 4.5.** *BMP15* geni c.-9 C>G heterozigot mutant saptanan olgu 12'ye ait dizi analizi görüntüsü.



**Şekil 4.6.** *BMP15* geni c.-9 C>G homozigot mutant saptanan olgu 46'ya ait dizi analizi görüntüsü.

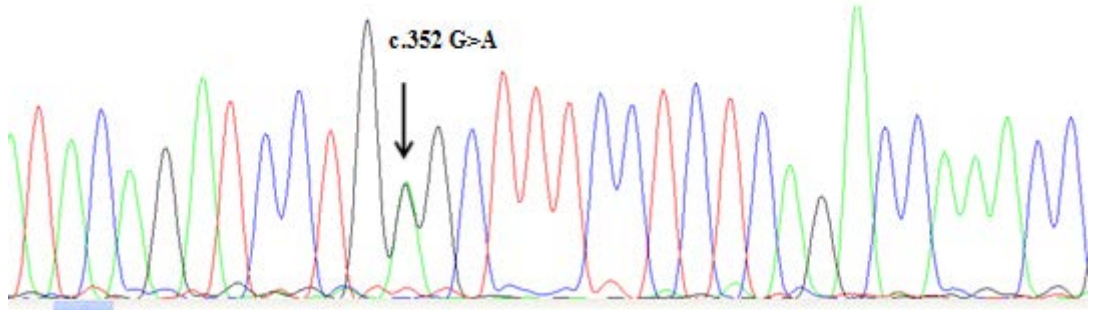
**c.308 A>G (rs41308602):** Missense varyanttır. Asparajinin serine (p.N103S) dönüşümüne neden olmaktadır (Şekil 4.8). Yapılan çalışmalarda bu değişiklik hasta ve kontrol gruplarında gösterilmiştir (204). *SIFT Blink* ve *PolyPhen-2* programları ile yapılan incelemede protein üzerindeki etkisinin tolere edilebilir ve benign olduğu öngörülmüştür. Bu varyant kontrol grubumuzda da 9 bireyde (% 11.2) saptanmıştır. Yine gerek hasta gerek kontrol grubunda tek başına değil aynı zamanda c.-9 G aleline sahip CG veya GG genotipine sahip bireylerde görülmüştür. Bu durum, c.308 A>G varyantının c.-9 G aleli ile aynı haplotip içinde yer aldığını düşündürmektedir.



**Şekil 4.7.** *BMP15* geni c.308 A>G heterozigot mutant saptanan olgu 12'ye ait dizi analizi görüntüsü.

**c.352 G>A (rs142156356):** Missense varyanttır. Glisinin serine (p.G118S) dönüşümüne neden olmaktadır (Şekil 4.8). *SIFT Blink* ve *PolyPhen-2* programları ile yapılan incelemede protein üzerindeki etkisinin tolere edilebilir ve benign olduğu

öngörülmüştür. Sadece bir hastada gözlenen bu varyant da tek başına değil aynı zamanda c.-9 G aleline sahip bireyde gözlenmiştir.



**Şekil 4.8.** *BMP15* geni c.352 G>A heterozigot mutant saptanan olgu 77'ye ait dizi analizi görüntüsü.

*FOXL2* geni:

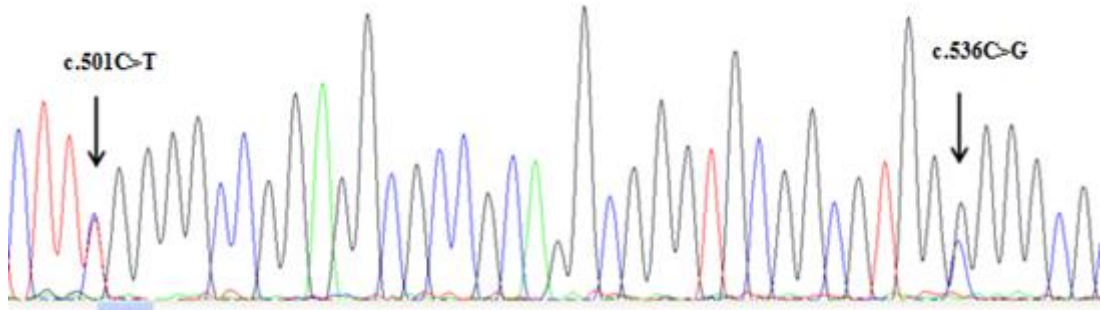
Üç fragman halinde gerçekleştirilen *FOXL2* geni dizi analizinde 71 hastada tüm fragmanların dizi analizi yapılmış, 8 hastada ise teknik nedenlerden dolayı sadece ilk iki fragmanda dizi analizi gerçekleştirilebilmiştir. Çalışmamızda 71 olgunun dördünde (% 5) *FOXL2* geninde değişiklik saptanmıştır. Üç olguda c.501 C>T ve c.536 C>G değişiklikleri, bir olguda c.672 A>T değişikliği saptanmıştır. Bulunan değişiklikler Tablo 4.4'te belirtilmiştir.

**Tablo 4.4.** *FOXL2* geninde bulunan değişiklikler.

| Olgu No | FOXL2                  |
|---------|------------------------|
| Olgu 1  | c.672 A>T              |
| Olgu 2  | c.501 C>T<br>c.536 C>G |
| Olgu 10 | c.501 C>T<br>c.536 C>G |
| Olgu 63 | c.501 C>T<br>c.536 C>G |

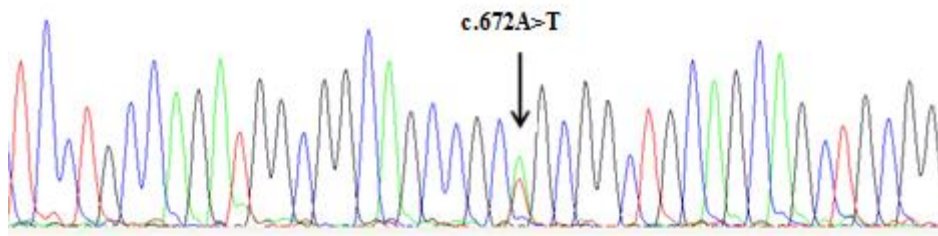
**c.501 C>T (rs61750361):** Sinonim varyanttır. Kodonda TTC/TTT dönüşümüne neden olup her iki durumda da fenilalanin kodlanmaktadır (Şekil 4.9).

**c.536 C>G (rs7432551):** Missense varyanttır. Kodonda GCG/GGG dönüşümüne neden olmaktadır. Bu dönüşüm 179. pozisyonda alaninin glisine (p.A179G) dönüşümüne neden olmaktadır. *PolyPhen-2* programı ile yapılan incelemede protein üzerinde hasar meydana getirme olasılığının bulunabileceği ancak *SIFT Blink* programı ile yapılan incelemede bu etkinin tolere edilebilir olduğu öngörülmüştür. Bu değişiklik daha önce yapılan çalışmalarda hasta ve kontrol gruplarında gösterilmiştir (Şekil 4.9) (205).



**Şekil 4.9.** *FOXL2* geni c.501 C>T ve c.536 C>G heterozigot mutant saptanan olgu 10'a ait dizi analizi görüntüsü.

**c.672 A>T (rs193922948):** Sinonim varyanttır. Kodonda GCA/GCT dönüşümüne neden olmaktadır. Her iki durumda da alanin kodlanmaktadır (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** *FOXL2* geni c.672 A>T heterozigot mutant saptanan olgu 1'e ait dizi analizi görüntüsü.

## 5. TARTIŞMA

POY etyolojisinden birçok gen sorumlu tutulmaktadır. Bu genler içerisinde fonksiyonel açıdan en fazla öneme sahip olanlar *BMP15* ve *FOXL2* genleridir. Bu çalışmada da *BMP15* ve *FOXL2* geni mutasyonlarının POY hastalarındaki sıklığı araştırılmıştır.

Çalışmamızda hastalarda *FOXL2* geninde POY ile ilişkilendirilebilecek bir değişiklik saptanmamıştır. Saptanan değişiklikler c.501 C>T, c.536 C>G ve c.672 A>T'dir. Bu değişikliklerden c.501 C>T ve c.672 A>T sessiz değişikliklerdir ve protein üzerinde bir değişikliğe neden olması beklenmemektedir. c.536 C>G değişikliği 179. pozisyonda alaninin glisine dönüşümüne neden olmasına rağmen protein üzerinde fonksiyonel bir değişiklik oluşturması beklenmemektedir. Literatürde POY vakalarında *FOXL2* geni ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (205-208). Bu çalışmalarda *FOXL2* geninde üç hastada POY ile ilişkilendirilebilecek değişiklik saptanmıştır. Bunlardan ilki, Slovenyalı bir hastada polialanin dizisinde 10 alaninin kısalmasına neden olan 30 bç'lik delesyondur. İkinci değişiklik ise Yeni Zelandalı bir hastada saptanan c.772 T>A (p.Y258N) değişikliği (205), üçüncü değişiklik de bir başka POY hastasında saptanan p.G187D değişikliğidir (209). Cinsiyet gelişimi, folikülogenez ve folikül havuzunun korunmasındaki önemli rolüne rağmen yapılan çalışmalar göstermektedir ki *FOXL2* kodlayan bölge mutasyonları POY'un sık görülen bir nedeni değildir.

*BMP15* mutasyonlarının sıklığı % 0-12 arasında değişmektedir (210). Farklı topluluklara ait *BMP15* mutasyon sıklıkları Tablo 5.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.1.** *BMP15* geni mutasyonlarının sıklığı. Persani ve ark. 2014'ten değiştirilerek alınmıştır (210).

| <b>Köken</b>                  | <b>Hasta sayısı</b> | <b>Non-sinonim varyasyonlu hasta yüzdesi (%)</b> | <b>Referans</b>                |
|-------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------|
| Japonya                       | 15                  | 0                                                | Takebayashi ve ark. 2000 (201) |
| Yeni Zelanda                  | 38                  | 0                                                | Chand ve ark. 2006 (211)       |
| Avrupa ve Amerika (beyaz ırk) | 166                 | 4.2                                              | Di Pasquale ve ark. 2006 (212) |
| Avrupa ve Kuzey Afrika        | 203                 | 1.5                                              | Laissue ve ark. 2006 (213)     |
| Hindistan                     | 202                 | 8.9                                              | Dixit ve ark. 2006 (204)       |
| Çin                           | 92                  | 0                                                | Zhang ve ark. 2007 (214)       |
| Avrupa                        | 20                  | 10.0                                             | Ledig ve ark. 2008 (215)       |
| İtalya ve Amerika (beyaz ırk) | 300                 | 4.3                                              | Rosetti ve ark. 2009 (216)     |
| Çin                           | 100                 | 6.0                                              | Wang ve ark. 2010 (217)        |
| Avrupa, Kuzey Afrika ve Asya  | 50                  | 12.0                                             | Tiotiu ve ark. 2010 (218)      |
| İtalya                        | 50                  | 2.0                                              | Ferrani ve ark. 2013 (219)     |

Yapılan çalışmalarda saptanan mutasyonların bazıları kontrol grubunda da bulunmaktadır. Bu mutasyonlar çıkarıldığında POY ile ilişkilendirilmiş mutasyon oranı daha da azalmaktadır. Japon ve Yeni Zelandalı hastalarda *BMP15* geninde mutasyon saptanmamıştır. Bu sonuç örnek sayısının az olmasına bağlanabileceği gibi (Japon ve Yeni Zelandalı hasta gruplarında 15 ve 38 hasta yer almıştır) genetik etyoloji ve mutasyon sıklıklarının etnik kökene göre değişiklik gösterebileceğini de düşündürmektedir. Yapılan çalışmaların sonuçları bu durumu desteklemekte, bir mutasyon bir etnik kökene ait hastalarda çok sık görülebilirken başka bir etnik kökende yaygın olarak saptanamayabilmektedir (78,84,109,110).

Bizim çalışmamızda *BMP15* geninde c.-9 C>G, c.308 A>G ve c.352 G>A değişiklikleri saptanmıştır. Bu değişikliklerden c.308 A>G değişikliği asparajinin serine; c.352 G>A değişikliği ise glisinin serine dönüşümüne neden olmaktadır. Bu değişiklikler kontrol gruplarında da gösterilen, protein üzerinde etkisi beklenmeyen değişikliklerdir. Çalışmamızda saptadığımız diğer bir değişiklik ise c.-9 C>G değişikliğidir.

### **BMP15 c.-9C>G**

Günümüze kadar *BMP15* geninin kodlayan bölgesine ait mutasyonlar 1200'den fazla POY tanılı kadın hastada araştırılmıştır. Bulunan değişikliklerden sadece dört değişikliğin (p.R68W, p.R138H, p.L148P, p.Y235C) in vitro fonksiyonel çalışması yapılarak POY'a neden olduğu kanıtlanmıştır. Bu mutasyonlara ek olarak *BMP15* c.-9 C>G değişikliğinin de in vitro fonksiyonel çalışma sonucunda *BMP15* geninin ekspresyonunda anlamlı derecede artışa neden olduğu ve POY'dan sorumlu olduğu ifade edilmiştir (203).

Moron ve ark.'ın yaptığı çalışmada *BMP15* alelleri ile ovaryan hiperstimülasyon sendromu arasında ilişki araştırılmıştır. Bu çalışmada 307 IVF uygulanan kadın incelenmiş, 35'inin over stimülasyonuna yüksek cevap verdiği gözlemlenmiştir. Bu hastalarda *BMP15* c.-9 G aleli ile over stimülasyonuna yüksek cevap arasında anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir (199).

Yapılan başka bir çalışmada Hanevik ve ark. belirledikleri SNP'ler ile over stimölasyon cevabı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Over stimölasyonuna yüksek cevap ile *BMP15* c.-9 G aleli arasında anlamlı ilişki olduğu ortaya konulmuştur (220). Yapılan bu çalışmalarda *BMP15* c.-9 G alelinin kadının erken dönemde primer folikül sayısının artmasına neden olmasından dolayı over stimölasyonuna verilen yüksek cevaba etki edeceğini belirtmişlerdir.

Fonseca ve ark.'ın yaptığı çalışmada *BMP15* c.-9 G alelinin POY ile ilişkisi gösterilmiştir. *BMP15*, *PITX1* (pituitary homebox 1) transkripsiyon faktörü ile beraber eksprese olmaktadır. *PITX1*, *BMP15* promoterinin -14 ile -8 pozisyonları arasına bağlanmaktadır. *PITX1*, her iki alelin varlığında da (c.-9 G ve c.-9 C) genin transaktivasyonuna neden olmaktadır. *BMP15* c.-9 C>G değişikliğinin *PITX1* bağlanma bölgesinin modifikasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu durumun *BMP15* transkripsiyonunda *PITX1*'a bağlı ve *PITX1*'dan bağımsız olarak artışa neden olduğunu ve bunun da POY'un nedeni olduğu belirtilmiştir.

*BMP15* c.-9 G alelinin varlığında *BMP15* ekspresyonun anlamlı derecede arttığı ve bu durumun granüloza hücrelerinin proliferasyon oranında değişime neden olacağı ifade edilmiştir. Diğer yandan yüksek ovaryan *BMP15* seviyesinin FSHR mRNA ekspresyonunun azalmasını daha da kolaylaştırdığı belirtilmiştir (203). Transgenik farelerde yapılan bir başka çalışmada *Bmp15*'in yüksek düzeyde eksprese olması halinde de benzer durum gözlemlenmiştir. Bu farelerin yüksek primer folikül sayısına sahipken, düşük sekonder foliküle sahip oldukları bildirilmiştir. Yüksek granüloza hücre mitozunun artmış primer folikül ve sekonder folikül atrezisi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (221). *BMP15* c.-9 G aleli erken dönemde artmış folikül sayısına yol açmasından dolayı POY'dan sorumlu tutulmaktadır.

Birçok çalışmada *BMP15* c.-9 C>G değişikliğinin POY ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Dixit ve ark.'ın 202 Hint kökenli POY hastasında yaptıkları çalışmada *BMP15* c.-9 G alelinin POY ile ilgili haplotipin bir parçası olduğu gösterilmiştir. POY hastalarında sık görülen üç varyantın (c.-9 C>G, c.308 A>G, c.852 C>T)

haplotip analizi yapılmış ve G-G-C haplotipi ile POY arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır (204).

Çalışmamızda haplotip analizi yapılmamıştır. Ancak elimizdeki bulguları değerlendirdiğimizde, c. 308 A>G varyantının hasta grubunda sadece c.-9 G aleline sahip CG ve GG genotiplerinde görülmesi ilk bakışta bu haplotipin hastalıkla ilişkili olduğunu düşündürebilir. Ancak aynı durumun kontrol grubunda da gözlenmiş olması ve ayrıca c. 308 A>G varyantının hasta ve kontrol grubunda yer alan heterozigot bireylerdeki dağılımının benzer olması, iki grup arasındaki heterozigot bireylerde saptanan farklılığın haplotipten kaynaklanmadığını buna dayanarak da hastalıkla ilişkili olan değişikliğin GG haplotipi değil c.-9 C>G heterozigotluğu olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

**Tablo 5.2.** c.-9 C>G ve c. 308 A>G varyantının hasta ve kontrol grubundaki dağılımı.

| HASTA (n=79) |               |           |               |          |               | KONTROL (n=80) |               |           |               |          |               |
|--------------|---------------|-----------|---------------|----------|---------------|----------------|---------------|-----------|---------------|----------|---------------|
| CC (n=41)    |               | CG (n=34) |               | GG (n=3) |               | CC (n=56)      |               | CG (n=15) |               | GG (n=9) |               |
| CC           | CC<br>+<br>AG | CG        | CG<br>+<br>AG | GG       | GG<br>+<br>AG | CC             | CC<br>+<br>AG | CG        | CG<br>+<br>AG | GG       | GG<br>+<br>AG |
| 41           | 0             | 21        | 13            | 2        | 1             | 56             | 0             | 10        | 5             | 5        | 4             |

Bizim çalışmamızda 79 olgunun 38'inde *BMP15* c.-9 C>G değişikliği saptanmıştır. Yapılan istatistiksel incelemede CG genotipi taşıyan bireylerin POY riskinin üç kat artmış olduğu görülmüştür ( $p<0.001$ ,  $OR=3,187$  % 95 CI (1.541-6.592)). İn vitro fonksiyonel çalışma sonuçları ve elde ettiğimiz bulgulara bakarak *BMP15* c.-9 C>G değişikliğinin toplumumuzdaki POY etyolojisinde önemli bir yeri olabileceği düşünülmektedir.

## 6. SONUÇLAR

Çalışmamızda sadece dört hastada *FOXL2* geninde değişiklik saptanmış ve bu değişiklikler POY ile ilişkilendirilememiştir.

*BMP15* geni mutasyonları daha sık görülmüş olmasına rağmen bu değişikliklerin de büyük kısmı POY ile ilişkili bulunmamıştır.

Öte yandan *BMP15* geninin 5' UTR bölgesinde yer alan ve promoter bölgesini içeren c.-9 C>G varyantı hasta grubunda oldukça yüksek oranda gözlenmiş ve özellikle CG genotipinin POY açısından önemli bir risk faktörü olduğu saptanmıştır. Gen ekspresyonu üzerindeki transkripsiyonu artırıcı etkisi de dikkate alındığında *BMP15* c.-9 C>G varyantının POY olgularında incelenmesi gereken genetik bir faktör olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

## ÖZET

Prematür over yetersizliği (POY) yüksek FSH düzeylerinin (40 IU/l ve üzeri) eşlik ettiği, düzenli menstrüel siklusların 40 yaşından önce 4-6 aydan uzun süre kesilmesi olarak tanımlanmaktadır. POY'a neden olabilecek birçok gen tanımlanmıştır. Folikülogenez ve folikül rezervinin korunmasındaki rolleri dikkate alındığında *FOXL2* ve *BMP15* genleri bunların en önemlileri arasında yer almaktadır.

Bu çalışma ile ülkemizdeki POY olgularında *FOXL2* ve *BMP15* geni mutasyonlarının sıklığı ve dağılımının saptanması ve bu bilgilere dayanılarak genetik test algoritması geliştirmek amaçlanmıştır.

Çalışmamıza POY ön tanısı olan, normal kromozomal kuruluşa sahip ve *FMRI* geni premutasyonu taşımayan 79 hasta dahil edilmiş ve bu hastalarda dizi analizi yöntemi kullanılarak *FOXL2* ve *BMP15* geni mutasyonları araştırılmıştır. *FOXL2* geninde % 5, *BMP15* geninde de % 48 oranında değişiklik saptanmıştır. Bu değişikliklerden *BMP15* c.-9 C>G varyantının POY ile ilişkili olduğu gözlenmiş ve bu varyantın POY açısından önemli bir risk faktörü olabileceği belirlenmiştir. Bu nedenle POY hastalarında bu varyanta yönelik genetik test uygulanması dikkate alınabilir.

**Anahtar Sözcükler:** Prematür over yetersizliği, POY, *FOXL2*, *BMP15*, *FMRI*, premutasyon

## SUMMARY

Premature ovarian insufficiency (POI) is defined as amenorrhea for at least 4-6 months before the age of 40 together with elevated FSH levels ( $\geq 40$  IU/l). Several genes were identified that may cause POI. *FOXL2* and *BMP15* are among the most important ones when considering their role in folliculogenesis and maintenance of follicle reserve.

In this study, it was aimed to determine the frequency and distribution of *FOXL2* and *BMP15* mutations in patients with POI and, based on this information, to develop genetic test algorithms for POI.

Seventy nine patients clinically diagnosed with POI having normal chromosomal constitution with no *FMRI* premutation were included in our study and *FOXL2* and *BMP15* mutations were investigated by DNA sequence analysis. The frequency of *FOXL2* and *BMP15* sequence changes were observed as 5 % and 48 %, respectively. Among them, *BMP15* c.-9 C>G variant was found to be associated with POI and determined as an important risk factor for POI. Therefore, genetic testing for this variant may be considered in POI patients.

**Anahtar Sözcükler:** Premature ovarian insufficiency, POI, *FOXL2*, *BMP15*, *FMRI*, premutation

## KAYNAKLAR

1. Conway GS. Premature ovarian failure. *Br Med Bull.* 2000;56(3):643-649.
2. Skillern A, Rajkovic A. Recent developments in identifying genetic determinants of premature ovarian failure. *Sex Dev.* 2008;2(4-5):228-243.
3. Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol.* 1986;67(4):604-606.
4. Özmen B, Diribaş K, Berker B, R. A. Prematür Ovaryan Yetmezlik. *T Klin Tıp Bilimleri.* 2002;T Klin Tıp Bilimleri(22(3)):328-332.
5. Persani L, Rossetti R, Cacciatori C. Genes involved in human premature ovarian failure. *J Mol Endocrinol.* 2010;45(5):257-279.
6. Bagur AC, Mautalen CA. Risk for developing osteoporosis in untreated premature menopause. *Calcif Tissue Int.* 1992;51(1):4-7.
7. Cox L, Liu JH. Primary ovarian insufficiency: an update. *Int J Womens Health.* 2014;6:235-243.
8. Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, Yamanaka K, Wakayama T, Saitou M. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell.* 2009;137(3):571-584.
9. Ying Y, Qi X, Zhao GQ. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(14):7858-7862.
10. Dixit H, Rao L, Padmalatha V, Raseswari T, Kapu AK, Panda B, Murthy K, Tosh D, Nallari P, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarthy B, Singh L. Genes governing premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online.* 2010;20(6):724-740.
11. Inceboz US. Klinik pratikte yaşlanan over. *J Turk Soc Obstet Gynecol.* 2005;2(1):15-20.
12. Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1127:1-9.
13. Pesce M, Klinger FG, De Felici M. Derivation in culture of primordial germ cells from cells of the mouse epiblast: phenotypic induction and growth control by Bmp4 signalling. *Mech Dev.* 2002;112(1-2):15-24.

14. Puglisi R, Montanari M, Chiarella P, Stefanini M, Boitani C. Regulatory role of BMP2 and BMP7 in spermatogonia and Sertoli cell proliferation in the immature mouse. *Eur J Endocrinol.* 2004;151(4):511-520.
15. Ross A, Munger S, Capel B. Bmp7 regulates germ cell proliferation in mouse fetal gonads. *Sex Dev.* 2007;1(2):127-137.
16. Jagarlamudi K, Rajkovic A. Oogenesis: transcriptional regulators and mouse models. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;356(1-2):31-39.
17. Sanchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(12):1896-1912.
18. Eggers S, Sinclair A. Mammalian sex determination-insights from humans and mice. *Chromosome Res.* 2012;20(1):215-238.
19. Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology.* 1995;136(8):3665-3668.
20. Rucker EB, 3rd, Dierisseau P, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Flaws JA, Hennighausen L. Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Mol Endocrinol.* 2000;14(7):1038-1052.
21. Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nat Genet.* 1999;21(2):200-203.
22. Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JC, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tilly JL, Yuan J. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev.* 1998;12(9):1304-1314.
23. Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev.* 2009;30(5):438-464.
24. Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P. The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol.* 1993;157(1):100-109.
25. Reddy P, Shen L, Ren C, Boman K, Lundin E, Ottander U, Lindgren P, Liu YX, Sun QY, Liu K. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHRL1 in mouse

and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Dev Biol.* 2005;281(2):160-170.

26. Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hamalainen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science.* 2008;319(5863):611-613.

27. Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science.* 2003;301(5630):215-218.

28. Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Ojeda SR. Role of neurotrophic factors in early ovarian development. *Semin Reprod Med.* 2009;27(1):24-31.

29. Paredes A, Romero C, Dissen GA, DeChiara TM, Reichardt L, Cornea A, Ojeda SR, Xu B. TrkB receptors are required for follicular growth and oocyte survival in the mammalian ovary. *Dev Biol.* 2004;267(2):430-449.

30. Nilsson EE, Skinner MK. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;214(1-2):19-25.

31. Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;188(1-2):65-73.

32. Kezele P, Nilsson EE, Skinner MK. Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol Reprod.* 2005;73(5):967-973.

33. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology.* 1999;140(12):5789-5796.

34. Nilsson EE, Skinner MK. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod.* 2003;69(4):1265-1272.

35. Nilsson E, Rogers N, Skinner MK. Actions of anti-Mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reproduction.* 2007;134(2):209-221.

36. Rankin T, Familiari M, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Drago J, Westphal H, Dean J. Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development*. 1996;122(9):2903-2910.
37. Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science*. 2004;305(5687):1157-1159.
38. Pangas SA, Choi Y, Ballow DJ, Zhao Y, Westphal H, Matzuk MM, Rajkovic A. Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(21):8090-8095.
39. Choi Y, Ballow DJ, Xin Y, Rajkovic A. Lim homeobox gene, *Lhx8*, is essential for mouse oocyte differentiation and survival. *Biol Reprod*. 2008;79(3):442-449.
40. Choi Y, Yuan D, Rajkovic A. Germ cell-specific transcriptional regulator *sohlh2* is essential for early mouse folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Biol Reprod*. 2008;79(6):1176-1182.
41. Georges A, Auguste A, Bessiere L, Vanet A, Todeschini AL, Veitia RA. FOXL2: a central transcription factor of the ovary. *J Mol Endocrinol*. 2014;52(1):R17-33.
42. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006;132(2):191-206.
43. Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJ, Hovatta O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):316-321.
44. Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem*. 2000;275(50):39523-39528.
45. Li R, Phillips DM, Mather JP. Activin promotes ovarian follicle development in vitro. *Endocrinology*. 1995;136(3):849-856.
46. Oktem OU, B. Reprodüktif Yaşam Siklusu: Folikülogenez Ve Menstruasyon. *J Turk Soc Obstet Gynecol*. 2012;9(1):1-24.

47. B. S, A. T. Menopozda Hormon Replasman Tedavisi Kullanımı ile İlgili Tartışmalar ve Güncel Yaklaşım. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi. 2004;3:38-43.
48. L. S, A. FM. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility (7th ed.) 2005;Philadelphia(Lippincott Williams and Wilkins).
49. Vujovic S, Iovic M, Tancic-Gajic M, Marina L, Barac M, Arizanovic Z, Nenezic A, Ivanisevic M, Micic J, Sajic S, Micic D. Premature ovarian failure. Srp Arh Celok Lek. 2012;140(11-12):806-811.
50. Conway GS. Premature ovarian failure. Curr Opin Obstet Gynecol. 1997;9(3):202-206.
51. Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. Hum Reprod Update. 2005;11(4):391-410.
52. Davison RM, Quilter CR, Webb J, Murray A, Fisher AM, Valentine A, Serhal P, Conway GS. A familial case of X chromosome deletion ascertained by cytogenetic screening of women with premature ovarian failure. Hum Reprod. 1998;13(11):3039-3041.
53. Cordts EB, Christofolini DM, Dos Santos AA, Bianco B, Barbosa CP. Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. Arch Gynecol Obstet. 2011;283(3):635-643.
54. Sybert VP, McCauley E. Turner's syndrome. N Engl J Med. 2004;351(12):1227-1238.
55. Reynaud K, Cortvrindt R, Verlinde F, De Schepper J, Bourgain C, Smitz J. Number of ovarian follicles in human fetuses with the 45,X karyotype. Fertil Steril. 2004;81(4):1112-1119.
56. Zinn AR, Ross JL. Turner syndrome and haploinsufficiency. Curr Opin Genet Dev. 1998;8(3):322-327.
57. Pasquino AM, Passeri F, Pucarelli I, Segni M, Municchi G. Spontaneous pubertal development in Turner's syndrome. Italian Study Group for Turner's Syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(6):1810-1813.
58. Welt CK. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. Clin Endocrinol (Oxf). 2008;68(4):499-509.
59. Fortuno C, Labarta E. Genetics of primary ovarian insufficiency: a review. J Assist Reprod Genet. 2014.

60. Otter M, Schrander-Stumpel CT, Curfs LM. Triple X syndrome: a review of the literature. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(3):265-271.
61. Jacobs PA, Baikie AG, Brown WM, Macgregor TN, Maclean N, Harnden DG. Evidence for the existence of the human "super female". *Lancet.* 1959;2(7100):423-425.
62. Willemsen R, Levenga J, Oostra BA. CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. *Clin Genet.* 2011;80(3):214-225.
63. Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, McConkie-Rosell A, Welt CK, Rebar RW, Corrigan EC, Simpson JL, Nelson LM. The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril.* 2007;87(3):456-465.
64. ACOG coN. Screening for fragile X syndrome. *Obstet Gynecol.* 2006;107:1483.
65. Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. *Genet Med.* 2005;7(8):584-587.
66. Sutherland GR, Baker E. Characterisation of a new rare fragile site easily confused with the fragile X. *Hum Mol Genet.* 1992;1(2):111-113.
67. Murray A, Webb J, Dennis N, Conway G, Morton N. Microdeletions in FMR2 may be a significant cause of premature ovarian failure. *J Med Genet.* 1999;36(10):767-770.
68. Lacombe A, Lee H, Zahed L, Choucair M, Muller JM, Nelson SF, Salameh W, Vilain E. Disruption of POF1B binding to nonmuscle actin filaments is associated with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet.* 2006;79(1):113-119.
69. Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A. NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet.* 2007;81(3):576-581.
70. Bouilly J, Bachelot A, Broutin I, Touraine P, Binart N. Novel NOBOX loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Hum Mutat.* 2011;32(10):1108-1113.
71. Zhao H, Chen ZJ, Qin Y, Shi Y, Wang S, Choi Y, Simpson JL, Rajkovic A. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet.* 2008;82(6):1342-1348.

72. Lourenco D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Junior G, Maciel-Guerra AT, Achermann JC, McElreavey K, Bashamboo A. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med*. 2009;360(12):1200-1210.
73. Caburet S, Zavadakova P, Ben-Neriah Z, Bouhali K, Dipietromaria A, Charon C, Besse C, Laissue P, Chalifa-Caspi V, Christin-Maitre S, Vaiman D, Levi G, Veitia RA, Fellous M. Genome-wide linkage in a highly consanguineous pedigree reveals two novel loci on chromosome 7 for non-syndromic familial Premature Ovarian Failure. *PLoS One*. 2012;7(3):e33412.
74. Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, Harrison W, Vaiman D, Ben-Neriah Z, Garcia-Tunon I, Fellous M, Pendas AM, Veitia RA, Vilain E. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med*. 2014;370(10):943-949.
75. Wang J, Zhang W, Jiang H, Wu BL, Primary Ovarian Insufficiency C. Mutations in HFM1 in recessive primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med*. 2014;370(10):972-974.
76. Aittomaki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Lehvaslaiho H, Engel AR, Nieschlag E, Huhtaniemi I, de la Chapelle A. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*. 1995;82(6):959-968.
77. Touraine P, Beau I, Gougeon A, Meduri G, Desroches A, Pichard C, Detoef M, Paniel B, Prieur M, Zorn JR, Milgrom E, Kuttann F, Misrahi M. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. *Mol Endocrinol*. 1999;13(11):1844-1854.
78. Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kiilavuori A, Huhtaniemi I, Forrest S, Aittomaki K. A Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(3):1151-1155.
79. Meduri G, Touraine P, Beau I, Lahuna O, Desroches A, Vacher-Lavenu MC, Kuttann F, Misrahi M. Delayed puberty and primary amenorrhea associated with a novel mutation of the human follicle-stimulating hormone receptor: clinical, histological, and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(8):3491-3498.

80. Layman LC, Shelley ME, Huey LO, Wall SW, Tho SP, McDonough PG. Follicle-stimulating hormone beta gene structure in premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 1993;60(5):852-857.
81. Conway GS, Conway E, Walker C, Hoppner W, Gromoll J, Simoni M. Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999;51(1):97-99.
82. Takakura K, Takebayashi K, Wang HQ, Kimura F, Kasahara K, Noda Y. Follicle-stimulating hormone receptor gene mutations are rare in Japanese women with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2001;75(1):207-209.
83. Sundblad V, Chiauuzzi VA, Escobar ME, Dain L, Charreau EH. Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF). *Mol Cell Endocrinol*. 2004;222(1-2):53-59.
84. Whitney EA, Layman LC, Chan PJ, Lee A, Peak DB, McDonough PG. The follicle-stimulating hormone receptor gene is polymorphic in premature ovarian failure and normal controls. *Fertil Steril*. 1995;64(3):518-524.
85. Liu JY, Gromoll J, Cedars MI, La Barbera AR. Identification of allelic variants in the follicle-stimulating hormone receptor genes of females with or without hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil Steril*. 1998;70(2):326-331.
86. Latronico AC, Anasti J, Arnhold IJ, Rapaport R, Mendonca BB, Bloise W, Castro M, Tsigos C, Chrousos GP. Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *N Engl J Med*. 1996;334(8):507-512.
87. Conway GS. Clinical manifestations of genetic defects affecting gonadotrophins and their receptors. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1996;45(6):657-663.
88. Matthews CH, Borgato S, Beck-Peccoz P, Adams M, Tone Y, Gambino G, Casagrande S, Tedeschini G, Benedetti A, Chatterjee VK. Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *Nat Genet*. 1993;5(1):83-86.

89. Takahashi K, Ozaki T, Okada M, Kurioka H, Kanasaki H, Miyazaki K. Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 1999;71(1):96-101.
90. Takahashi K, Karino K, Kanasaki H, Kurioka H, Ozaki T, Yonehara T, Miyazaki K. Influence of missense mutation and silent mutation of LHbeta-subunit gene in Japanese patients with ovulatory disorders. *Eur J Hum Genet*. 2003;11(5):402-408.
91. Soules MR, Battaglia DE, Klein NA. Inhibin and reproductive aging in women. *Maturitas*. 1998;30(2):193-204.
92. MacNaughton J, Banah M, McCloud P, Hee J, Burger H. Age related changes in follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1992;36(4):339-345.
93. Petraglia F, Hartmann B, Luisi S, Florio P, Kirchengast S, Santuz M, Genazzani AD, Genazzani AR. Low levels of serum inhibin A and inhibin B in women with hypergonadotropic amenorrhea and evidence of high levels of activin A in women with hypothalamic amenorrhea. *Fertil Steril*. 1998;70(5):907-912.
94. Shelling AN, Burton KA, Chand AL, van Ee CC, France JT, Farquhar CM, Milsom SR, Love DR, Gersak K, Aittomaki K, Winship IM. Inhibin: a candidate gene for premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2000;15(12):2644-2649.
95. Marozzi A, Porta C, Vegetti W, Crosignani PG, Tibiletti MG, Dalpra L, Ginelli E. Mutation analysis of the inhibin alpha gene in a cohort of Italian women affected by ovarian failure. *Hum Reprod*. 2002;17(7):1741-1745.
96. Dixit H, Deendayal M, Singh L. Mutational analysis of the mature peptide region of inhibin genes in Indian women with ovarian failure. *Hum Reprod*. 2004;19(8):1760-1764.
97. Jeong HJ, Cho SW, Kim HA, Lee SH, Cho JH, Choi DH, Kwon H, Cha WT, Han JE, Cha KY. G769A variation of inhibin alpha-gene in Korean women with premature ovarian failure. *Yonsei Med J*. 2004;45(3):479-482.
98. Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Oldfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K, Somer H, Suomalainen A. Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet*. 2004;364(9437):875-882.

99. Fogli A, Rodriguez D, Eymard-Pierre E, Bouhour F, Labauge P, Meaney BF, Zeesman S, Kaneski CR, Schiffmann R, Boespflug-Tanguy O. Ovarian failure related to eukaryotic initiation factor 2B mutations. *Am J Hum Genet.* 2003;72(6):1544-1550.
100. Fogli A, Gauthier-Barichard F, Schiffmann R, Vanderhoof VH, Bakalov VK, Nelson LM, Boespflug-Tanguy O. Screening for known mutations in EIF2B genes in a large panel of patients with premature ovarian failure. *BMC Womens Health.* 2004;4(1):8.
101. Gong Y, Krakow D, Marcelino J, Wilkin D, Chitayat D, Babul-Hirji R, Hudgins L, Cremers CW, Cremers FP, Brunner HG, Reinker K, Rimoin DL, Cohn DH, Goodman FR, Reardon W, Patton M, Francomano CA, Warman ML. Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat Genet.* 1999;21(3):302-304.
102. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, Affolter M, Vale WW, Izpisua Belmonte JC, Choe S. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature.* 2002;420(6916):636-642.
103. Kosaki K, Sato S, Hasegawa T, Matsuo N, Suzuki T, Ogata T. Premature ovarian failure in a female with proximal symphalangism and Noggin mutation. *Fertil Steril.* 2004;81(4):1137-1139.
104. Dixit H, Rao LK, Padmalatha V, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakravarty B, Singh L. Mutational screening of the coding region of growth differentiation factor 9 gene in Indian women with ovarian failure. *Menopause.* 2005;12(6):749-754.
105. Zhao H, Qin Y, Kovanci E, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A. Analyses of GDF9 mutation in 100 Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 2007;88(5):1474-1476.
106. Dixit H, Rao KL, Padmalatha VV, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarty BN, Singh L. Mutational analysis of the betaglycan gene-coding region in susceptibility for ovarian failure. *Hum Reprod.* 2006;21(8):2041-2046.

107. Qin Y, Zhao H, Kovanci E, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A. Mutation analysis of NANOS3 in 80 Chinese and 88 Caucasian women with premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 2007;88(5):1465-1467.
108. Watkins WJ, Umbers AJ, Woad KJ, Harris SE, Winship IM, Gersak K, Shelling AN. Mutational screening of FOXO3A and FOXO1A in women with premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 2006;86(5):1518-1521.
109. Qin Y, Vujovic S, Li G, Li J, Dagleish R, Simpson JL, Ivanisevic M, Iovic M, Tancic M, Al-Azzawi F, Chen ZJ. Ethnic specificity of variants of the ESR1, HK3, BRSK1 genes and the 8q22.3 locus: no association with premature ovarian failure (POF) in Serbian women. *Maturitas*. 2014;77(1):64-67.
110. Liu L, Tan R, Cui Y, Liu J, Wu J. Estrogen receptor alpha gene (ESR1) polymorphisms associated with idiopathic premature ovarian failure in Chinese women. *Gynecol Endocrinol*. 2013;29(2):182-185.
111. Ojeda D, Lakhal B, Fonseca DJ, Braham R, Landolsi H, Mateus HE, Restrepo CM, Elghezal H, Saad A, Laissue P. Sequence analysis of the CDKN1B gene in patients with premature ovarian failure reveals a novel mutation potentially related to the phenotype. *Fertil Steril*. 2011;95(8):2658-2660 e2651.
112. Fonseca DJ, Ojeda D, Lakhal B, Braham R, Eggers S, Turbitt E, White S, Grover S, Warne G, Zacharin M, Nevin Lam A, Landolsi H, Elghezal H, Saad A, Restrepo CM, Fellous M, Sinclair A, Koopman P, Laissue P. CITED2 mutations potentially cause idiopathic premature ovarian failure. *Transl Res*. 2012;160(5):384-388.
113. Mandon-Pepin B, Touraine P, Kuttann F, Derbois C, Rouxel A, Matsuda F, Nicolas A, Cotinot C, Fellous M. Genetic investigation of four meiotic genes in women with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*. 2008;158(1):107-115.
114. Rubio-Gozalbo ME, Panis B, Zimmermann LJ, Spaapen LJ, Menheere PP. The endocrine system in treated patients with classical galactosemia. *Mol Genet Metab*. 2006;89(4):316-322.
115. Calderon FR, Phansalkar AR, Crockett DK, Miller M, Mao R. Mutation database for the galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) gene. *Hum Mutat*. 2007;28(10):939-943.

116. Tyfield L, Reichardt J, Fridovich-Keil J, Croke DT, Elsas LJ, 2nd, Strobl W, Kozak L, Coskun T, Novelli G, Okano Y, Zekanowski C, Shin Y, Boleda MD. Classical galactosemia and mutations at the galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) gene. *Hum Mutat.* 1999;13(6):417-430.
117. Waggoner DD, Buist NR, Donnell GN. Long-term prognosis in galactosaemia: results of a survey of 350 cases. *J Inherit Metab Dis.* 1990;13(6):802-818.
118. Laml T, Preyer O, Umek W, Hengstschlager M, Hanzal H. Genetic disorders in premature ovarian failure. *Hum Reprod Update.* 2002;8(5):483-491.
119. Chen YT, Mattison DR, Feigenbaum L, Fukui H, Schulman JD. Reduction in oocyte number following prenatal exposure to a diet high in galactose. *Science.* 1981;214(4525):1145-1147.
120. Prestoz LL, Couto AS, Shin YS, Petry KG. Altered follicle stimulating hormone isoforms in female galactosaemia patients. *Eur J Pediatr.* 1997;156(2):116-120.
121. Sreenivasulu G, Senthilkumaran B. A role for cytochrome P450 17alpha-hydroxylase/c17-20 lyase during shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;115(3-5):77-85.
122. Lin D, Sugawara T, Strauss JF, 3rd, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science.* 1995;267(5205):1828-1831.
123. Conte FA, Grumbach MM, Ito Y, Fisher CR, Simpson ER. A syndrome of female pseudohermaphroditism, hypergonadotropic hypogonadism, and multicystic ovaries associated with missense mutations in the gene encoding aromatase (P450arom). *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78(6):1287-1292.
124. Bjursell C, Stibler H, Wahlstrom J, Kristiansson B, Skovby F, Stromme P, Blennow G, Martinsson T. Fine mapping of the gene for carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome, type I (CDG1): linkage disequilibrium and founder effect in Scandinavian families. *Genomics.* 1997;39(3):247-253.

125. Kim TJ, Anasti JN, Flack MR, Kimzey LM, Defensor RA, Nelson LM. Routine endocrine screening for patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *Obstet Gynecol.* 1997;89(5 Pt 1):777-779.
126. Bakalov VK, Vanderhoof VH, Bondy CA, Nelson LM. Adrenal antibodies detect asymptomatic auto-immune adrenal insufficiency in young women with spontaneous premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 2002;17(8):2096-2100.
127. Ahonen P, Myllarniemi S, Sipila I, Perheentupa J. Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *N Engl J Med.* 1990;322(26):1829-1836.
128. Perheentupa J. Autoimmune polyendocrinopathy--candidiasis--ectodermal dystrophy (APECED). *Horm Metab Res.* 1996;28(7):353-356.
129. N.R. LDI. Premature ovarian failure: Think "autoimmune disorder". *Sexuality, Reproduction and Menopause.* 2004;2(4):230-233.
130. Simpson JL. Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: overview of selected candidate genes. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1135:146-154.
131. Koyama H, Wada T, Nishizawa Y, Iwanaga T, Aoki Y. Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. *Cancer.* 1977;39(4):1403-1409.
132. Howell S, Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998;27(4):927-943.
133. Beerendonk CC, Braat DD. Present and future options for the preservation of fertility in female adolescents with cancer. *Endocr Dev.* 2005;8:166-175.
134. Morris ID, Shalet SM. Protection of gonadal function from cytotoxic chemotherapy and irradiation. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1990;4(1):97-118.
135. Thibaud E, Ramirez M, Brauner R, Flamant F, Zucker JM, Fekete C, Rappaport R. Preservation of ovarian function by ovarian transposition performed before pelvic irradiation during childhood. *J Pediatr.* 1992;121(6):880-884.
136. Morrison JC, Givens JR, Wiser WL, Fish SA. Mumps oophoritis: a cause of premature menopause. *Fertil Steril.* 1975;26(7):655-659.
137. Di Prospero F, Luzi S, Iacopini Z. Cigarette smoking damages women's reproductive life. *Reprod Biomed Online.* 2004;8(2):246-247.

138. Klein P, Serje A, Pezzullo JC. Premature ovarian failure in women with epilepsy. *Epilepsia*. 2001;42(12):1584-1589.
139. Sharara FI, Seifer DB, Flaws JA. Environmental toxicants and female reproduction. *Fertil Steril*. 1998;70(4):613-622.
140. Kalantaridou SN, Davis SR, Nelson LM. Premature ovarian failure. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1998;27(4):989-1006.
141. Anasti JN, Kalantaridou SN, Kimzey LM, Defensor RA, Nelson LM. Bone loss in young women with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *Obstet Gynecol*. 1998;91(1):12-15.
142. Graziottin A, Basson R. Sexual dysfunction in women with premature menopause. *Menopause*. 2004;11(6 Pt 2):766-777.
143. Simon J, Braunstein G, Nachtigall L, Utian W, Katz M, Miller S, Waldbaum A, Bouchard C, Derzko C, Buch A, Rodenberg C, Lucas J, Davis S. Testosterone patch increases sexual activity and desire in surgically menopausal women with hypoactive sexual desire disorder. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(9):5226-5233.
144. Johnson TR, Jr., Peterson EP. Gonadotropin-induced pregnancy following "premature ovarian failure". *Fertil Steril*. 1979;31(3):351-352.
145. Shapiro AG, Rubin A. Spontaneous pregnancy in association with hypergonadotropic ovarian failure. *Fertil Steril*. 1977;28(4):500-501.
146. van Kasteren YM, Hoek A, Schoemaker J. Ovulation induction in premature ovarian failure: a placebo-controlled randomized trial combining pituitary suppression with gonadotropin stimulation. *Fertil Steril*. 1995;64(2):273-278.
147. Falcone T, Bedaiwy MA. Fertility preservation and pregnancy outcome after malignancy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005;17(1):21-26.
148. Howell SJ, Shalet SM. Fertility preservation and management of gonadal failure associated with lymphoma therapy. *Curr Oncol Rep*. 2002;4(5):443-452.
149. Morice P, Juncker L, Rey A, El-Hassan J, Haie-Meder C, Castaigne D. Ovarian transposition for patients with cervical carcinoma treated by radiosurgical combination. *Fertil Steril*. 2000;74(4):743-748.
150. Tinga DJ, Dolsma WV, Tamminga RY, van der Zee AG. [Preservation of ovarian function in 2 young women with Hodgkin disease by laparoscopic

- transposition of the ovaries prior to abdominal irradiation]. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 1999;143(6):308-312.
151. Hovatta O. Cryopreservation and culture of human ovarian cortical tissue containing early follicles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;113 Suppl 1:S50-54.
  152. Posada MN, Kolp L, Garcia JE. Fertility options for female cancer patients: facts and fiction. *Fertil Steril*. 2001;75(4):647-653.
  153. de Boer EJ, den Tonkelaar I, te Velde ER, Burger CW, van Leeuwen FE, group OM-p. Increased risk of early menopausal transition and natural menopause after poor response at first IVF treatment. *Hum Reprod*. 2003;18(7):1544-1552.
  154. Lutchman Singh K, Davies M, Chatterjee R. Fertility in female cancer survivors: pathophysiology, preservation and the role of ovarian reserve testing. *Hum Reprod Update*. 2005;11(1):69-89.
  155. Verdin H, De Baere E. FOXL2 impairment in human disease. *Horm Res Paediatr*. 2012;77(1):2-11.
  156. Beysen D, De Paepe A, De Baere E. FOXL2 mutations and genomic rearrangements in BPES. *Hum Mutat*. 2009;30(2):158-169.
  157. Beysen D, Moumne L, Veitia R, Peters H, Leroy BP, De Paepe A, De Baere E. Missense mutations in the forkhead domain of FOXL2 lead to subcellular mislocalization, protein aggregation and impaired transactivation. *Hum Mol Genet*. 2008;17(13):2030-2038.
  158. Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A, Pilia G. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet*. 2001;27(2):159-166.
  159. Beysen D, Raes J, Leroy BP, Lucassen A, Yates JR, Clayton-Smith J, Ilyina H, Brooks SS, Christin-Maitre S, Fellous M, Fryns JP, Kim JR, Lapunzina P, Lemyre E, Meire F, Messiaen LM, Oley C, Splitt M, Thomson J, Van de Peer Y, Veitia RA, De Paepe A, De Baere E. Deletions involving long-range conserved

- nongenic sequences upstream and downstream of FOXL2 as a novel disease-causing mechanism in blepharophimosis syndrome. *Am J Hum Genet.* 2005;77(2):205-218.
160. de Santa Barbara P, Mejean C, Moniot B, Malcles MH, Berta P, Boizet-Bonhoure B. Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. *Biol Reprod.* 2001;64(3):775-783.
  161. Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW, Viger RS. A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol Biol.* 2008;9:44.
  162. Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, de Rooij DG, Schedl A, Chaboissier MC. Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet.* 2008;17(9):1264-1277.
  163. Liu CF, Bingham N, Parker K, Yao HH. Sex-specific roles of beta-catenin in mouse gonadal development. *Hum Mol Genet.* 2009;18(3):405-417.
  164. Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development.* 2004;131(4):933-942.
  165. Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet.* 2004;13(11):1171-1181.
  166. Boulanger L, Kocer A, Daniel N, Pannetier M, Chesne P, Heyman Y, Renault L, Mandon-Pepin B, Chavatte-Palmer P, Vignon X, Vilotte JL, Cotinot C, Renard JP, Pailhoux E. Attempt to rescue sex-reversal by transgenic expression of the PISRT1 gene in XX PIS<sup>-/-</sup> goats. *Sex Dev.* 2008;2(3):142-151.
  167. Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature.* 2011;476(7358):101-104.
  168. Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier AC, Klugmann C, Klasen C, Holter NI, Riethmacher D, Schutz G, Cooney AJ,

- Lovell-Badge R, Treier M. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*. 2009;139(6):1130-1142.
169. Jorgez CJ, Klysik M, Jamin SP, Behringer RR, Matzuk MM. Granulosa cell-specific inactivation of follistatin causes female fertility defects. *Mol Endocrinol*. 2004;18(4):953-967.
  170. Yao HH, Matzuk MM, Jorgez CJ, Menke DB, Page DC, Swain A, Capel B. Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn*. 2004;230(2):210-215.
  171. Pannetier M, Fabre S, Batista F, Kocer A, Renault L, Jolivet G, Mandon-Pepin B, Cotinot C, Veitia R, Pailhoux E. FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J Mol Endocrinol*. 2006;36(3):399-413.
  172. Fleming NI, Knowler KC, Lazarus KA, Fuller PJ, Simpson ER, Clyne CD. Aromatase is a direct target of FOXL2: C134W in granulosa cell tumors via a single highly conserved binding site in the ovarian specific promoter. *PLoS One*. 2010;5(12):e14389.
  173. Pisarska MD, Barlow G, Kuo FT. Minireview: roles of the forkhead transcription factor FOXL2 in granulosa cell biology and pathology. *Endocrinology*. 2011;152(4):1199-1208.
  174. Dai A, Sun H, Fang T, Zhang Q, Wu S, Jiang Y, Ding L, Yan G, Hu Y. MicroRNA-133b stimulates ovarian estradiol synthesis by targeting Foxl2. *FEBS Lett*. 2013;587(15):2474-2482.
  175. Rosario R, Araki H, Print CG, Shelling AN. The transcriptional targets of mutant FOXL2 in granulosa cell tumours. *PLoS One*. 2012;7(9):e46270.
  176. Park M, Shin E, Won M, Kim JH, Go H, Kim HL, Ko JJ, Lee K, Bae J. FOXL2 interacts with steroidogenic factor-1 (SF-1) and represses SF-1-induced CYP17 transcription in granulosa cells. *Mol Endocrinol*. 2010;24(5):1024-1036.
  177. Caburet S, Georges A, L'Hote D, Todeschini AL, Benayoun BA, Veitia RA. The transcription factor FOXL2: at the crossroads of ovarian physiology and pathology. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;356(1-2):55-64.
  178. Escudero JM, Haller JL, Clay CM, Escudero KW. Microarray analysis of Foxl2 mediated gene regulation in the mouse ovary derived KK1 granulosa cell line:

Over-expression of Foxl2 leads to activation of the gonadotropin releasing hormone receptor gene promoter. *J Ovarian Res.* 2010;3(1):4.

179. Tran S, Zhou X, Lafleur C, Calderon MJ, Ellsworth BS, Kimmins S, Boehm U, Treier M, Boerboom D, Bernard DJ. Impaired fertility and FSH synthesis in gonadotrope-specific Foxl2 knockout mice. *Mol Endocrinol.* 2013;27(3):407-421.

180. Shah SP, Kobel M, Senz J, Morin RD, Clarke BA, Wiegand KC, Leung G, Zayed A, Mehl E, Kalloger SE, Sun M, Giuliany R, Yorlida E, Jones S, Varhol R, Swenerton KD, Miller D, Clement PB, Crane C, Madore J, Provencher D, Leung P, DeFazio A, Khattra J, Turashvili G, Zhao Y, Zeng T, Glover JN, Vanderhyden B, Zhao C, Parkinson CA, Jimenez-Linan M, Bowtell DD, Mes-Masson AM, Brenton JD, Aparicio SA, Boyd N, Hirst M, Gilks CB, Marra M, Huntsman DG. Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary. *N Engl J Med.* 2009;360(26):2719-2729.

181. Kim JH, Yoon S, Park M, Park HO, Ko JJ, Lee K, Bae J. Differential apoptotic activities of wild-type FOXL2 and the adult-type granulosa cell tumor-associated mutant FOXL2 (C134W). *Oncogene.* 2011;30(14):1653-1663.

182. Batista F, Vaiman D, Dausset J, Fellous M, Veitia RA. Potential targets of FOXL2, a transcription factor involved in craniofacial and follicular development, identified by transcriptomics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(9):3330-3335.

183. Bentsi-Barnes IK, Kuo FT, Barlow GM, Pisarska MD. Human forkhead L2 represses key genes in granulosa cell differentiation including aromatase, P450scc, and cyclin D2. *Fertil Steril.* 2010;94(1):353-356.

184. Benayoun BA, Batista F, Auer J, Dipietromaria A, L'Hote D, De Baere E, Veitia RA. Positive and negative feedback regulates the transcription factor FOXL2 in response to cell stress: evidence for a regulatory imbalance induced by disease-causing mutations. *Hum Mol Genet.* 2009;18(4):632-644.

185. Moumne L, Dipietromaria A, Batista F, Kocer A, Fellous M, Pailhoux E, Veitia RA. Differential aggregation and functional impairment induced by polyalanine expansions in FOXL2, a transcription factor involved in cranio-facial and ovarian development. *Hum Mol Genet.* 2008;17(7):1010-1019.

186. L'Hote D, Georges A, Todeschini AL, Kim JH, Benayoun BA, Bae J, Veitia RA. Discovery of novel protein partners of the transcription factor FOXL2 provides insights into its physiopathological roles. *Hum Mol Genet.* 2012;21(14):3264-3274.
187. Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol.* 1998;12(12):1809-1817.
188. Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Butzow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(8):2744-2750.
189. Mester B. The intraovarian cellular origins of GDF9 and BMP15 in the mouse and aspects of their biological properties. 2013.
190. Moore RK, Shimasaki S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;234(1-2):67-73.
191. Marsh AT. Oocyte-Follicle Interactions. *M Med Sci.* 2011.
192. Otsuka F, Moore RK, Iemura S, Ueno N, Shimasaki S. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(5):961-966.
193. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 1996;383(6600):531-535.
194. Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev.* 2004;25(1):72-101.
195. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet.* 2004;75(1):106-111.
196. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet.* 2000;25(3):279-283.

197. Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 22):5257-5268.
198. Yoshino O, McMahon HE, Sharma S, Shimasaki S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(28):10678-10683.
199. Moron FJ, de Castro F, Royo JL, Montoro L, Mira E, Saez ME, Real LM, Gonzalez A, Manes S, Ruiz A. Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) alleles predict over-response to recombinant follicle stimulation hormone and iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Pharmacogenet Genomics.* 2006;16(7):485-495.
200. Wu YT, Tang L, Cai J, Lu XE, Xu J, Zhu XM, Luo Q, Huang HF. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Hum Reprod.* 2007;22(6):1526-1531.
201. Takebayashi K, Takakura K, Wang H, Kimura F, Kasahara K, Noda Y. Mutation analysis of the growth differentiation factor-9 and -9B genes in patients with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2000;74(5):976-979.
202. Hu S, Guo J, Wang B, Wang J, Zhou Z, Zhou G, Ding X, Ma X, Qi Y. Genetic analysis of the FOXL2 gene using quantitative real-time PCR in Chinese patients with blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome. *Mol Vis.* 2011;17:436-442.
203. Fonseca DJ, Ortega-Recalde O, Esteban-Perez C, Moreno-Ortiz H, Patino LC, Bermudez OM, Ortiz AM, Restrepo CM, Lucena E, Laissue P. BMP15 c.-9C>G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online.* 2014.
204. Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarty B, Singh L. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet.* 2006;119(4):408-415.

205. Harris SE, Chand AL, Winship IM, Gersak K, Aittomaki K, Shelling AN. Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(8):729-733.
206. Bodega B, Porta C, Crosignani PG, Ginelli E, Marozzi A. Mutations in the coding region of the FOXL2 gene are not a major cause of idiopathic premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod*. 2004;10(8):555-557.
207. Ni F, Wen Q, Wang B, Zhou S, Wang J, Mu Y, Ma X, Cao Y. Mutation analysis of FOXL2 gene in Chinese patients with premature ovarian failure. *Gynecol Endocrinol*. 2010;26(4):246-249.
208. Chatterjee S, Modi D, Maitra A, Kadam S, Patel Z, Gokrall J, Meherji P. Screening for FOXL2 gene mutations in women with premature ovarian failure: an Indian experience. *Reprod Biomed Online*. 2007;15(5):554-560.
209. Laissue P, Lakhal B, Benayoun BA, Dipietromaria A, Braham R, Elghezal H, Philibert P, Saad A, Sultan C, Fellous M, Veitia RA. Functional evidence implicating FOXL2 in non-syndromic premature ovarian failure and in the regulation of the transcription factor OSR2. *J Med Genet*. 2009;46(7):455-457.
210. Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, Cacciatore C, Fabre S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum Reprod Update*. 2014;20(6):869-883.
211. Chand AL, Ponnampalam AP, Harris SE, Winship IM, Shelling AN. Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 2006;86(4):1009-1012.
212. Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L, Einaudi S, Radetti G, Russo G, Sacco M, Wasniewska M, Cole T, Beck-Peccoz P, Nelson LM, Persani L. Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(5):1976-1979.
213. Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K, Bourcigaux N, Jacquesson L, Bouchard P, Frydman R, Dewailly D, Reyss AC, Jeffery L, Bachelot A, Massin N, Fellous M, Veitia RA. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*. 2006;154(5):739-744.

214. Zhang P, Shi YH, Wang LC, Chen ZJ. Sequence variants in exons of the BMP-15 gene in Chinese patients with premature ovarian failure. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2007;86(5):585-589.
215. Ledig S, Ropke A, Haeusler G, Hinney B, Wieacker P. BMP15 mutations in XX gonadal dysgenesis and premature ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(1):84 e81-85.
216. Rossetti R, Di Pasquale E, Marozzi A, Bione S, Toniolo D, Grammatico P, Nelson LM, Beck-Peccoz P, Persani L. BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum Mutat*. 2009;30(5):804-810.
217. Wang B, Wen Q, Ni F, Zhou S, Wang J, Cao Y, Ma X. Analyses of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) mutation in Chinese women with premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(1):135-136.
218. Tiotiu D, Alvaro Mercadal B, Imbert R, Verbist J, Demeestere I, De Leener A, Englert Y, Vassart G, Costagliola S, Delbaere A. Variants of the BMP15 gene in a cohort of patients with premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2010;25(6):1581-1587.
219. Ferrarini E, Russo L, Fruzzetti F, Agretti P, De Marco G, Dimida A, Gianetti E, Simoncini T, Simi P, Baldinotti F, Benelli E, Pucci E, Pinchera A, Vitti P, Tonacchera M. Clinical characteristics and genetic analysis in women with premature ovarian insufficiency. *Maturitas*. 2013;74(1):61-67.
220. Hanevik HI, Hilmarsen HT, Skjelbred CF, Tanbo T, Kahn JA. A single nucleotide polymorphism in BMP15 is associated with high response to ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online*. 2011;23(1):97-104.
221. McMahon HE, Hashimoto O, Mellon PL, Shimasaki S. Oocyte-specific overexpression of mouse bone morphogenetic protein-15 leads to accelerated folliculogenesis and an early onset of acyclicity in transgenic mice. *Endocrinology*. 2008;149(6):2807-2815.

## EK-1

### ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

|                               |                                                     |                                                                                  |                                               |                                          |  |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------|--|
| BAŞVURU BİLGİLERİ             | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI                               | Prematüre over yetersizliği olan hastalarda BMP15 VE Fbxl2 geni mutasyon analizi |                                               |                                          |  |
|                               | ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU                             |                                                                                  |                                               |                                          |  |
|                               | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI   | Yrd.Doç.Dr.Halil Gürhan Karabulut                                                |                                               |                                          |  |
|                               | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI   | Tıbbi Genetik                                                                    |                                               |                                          |  |
|                               | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ | Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı                    |                                               |                                          |  |
|                               | DESTEKLEYİCİ                                        |                                                                                  |                                               |                                          |  |
|                               | DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ                    |                                                                                  |                                               |                                          |  |
|                               | ARAŞTIRMANIN FAZİ                                   | FAZ 1                                                                            | <input type="checkbox"/>                      |                                          |  |
|                               |                                                     | FAZ 2                                                                            | <input type="checkbox"/>                      |                                          |  |
|                               |                                                     | FAZ 3                                                                            | <input type="checkbox"/>                      |                                          |  |
| FAZ 4                         |                                                     | <input type="checkbox"/>                                                         |                                               |                                          |  |
| ARAŞTIRMANIN TÜRÜ             | Yeni Bir Endikasyon                                 | <input type="checkbox"/>                                                         |                                               |                                          |  |
|                               | Yüksek Doz Araştırması                              | <input type="checkbox"/>                                                         |                                               |                                          |  |
|                               | Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar Çalışması         |                                                                                  |                                               |                                          |  |
| ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER | TEK MERKEZ<br><input type="checkbox"/>              | ÇOK MERKEZLİ<br><input checked="" type="checkbox"/>                              | ULUSAL<br><input checked="" type="checkbox"/> | ULUSLARARASI<br><input type="checkbox"/> |  |


 ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
 TIP FAKÜLTESİ  
 KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU  
 10.8.2014  
 ASLI GİDİYOR

## EK-1 (Devam)

| DEĞERLENDİRİLEN BELGELER                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Belge Adı                           | Tarihi                                                                    | Versiyon Numarası | Dili <sup>1</sup>                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ                 |                                                                           |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU |                                                                           |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | OLGU RAPOR FORMU                    |                                                                           |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ                   |                                                                           |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
| DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Belge Adı                           |                                                                           |                   | Açıklama                                                                                          |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ                | <input type="checkbox"/>                                                  |                   |                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | SIGORTA                             | <input type="checkbox"/>                                                  |                   |                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | ARAŞTIRMA BÜTÇESİ                   | <input type="checkbox"/>                                                  |                   |                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | BIYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU  | <input type="checkbox"/>                                                  |                   |                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ              | <input type="checkbox"/>                                                  |                   |                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | ILAN                                | <input type="checkbox"/>                                                  |                   |                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | YILLIK BİLDİRİM                     | <input type="checkbox"/>                                                  |                   |                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | SONUÇ RAPORU <sup>2</sup>           | <input type="checkbox"/>                                                  |                   |                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ             | <input type="checkbox"/>                                                  |                   |                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | DİĞER:                              | <input type="checkbox"/>                                                  |                   |                                                                                                   |
| KARAR BİLGİLERİ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Karar No:05-187-13                  | Tarih: 25 Mart 2013                                                       |                   |                                                                                                   |
| Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile bilgilendirilmiş gönüllü olur formu incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. |                                     |                                                                           |                   |                                                                                                   |
| <b>ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                     |                                                                           |                   |                                                                                                   |
| ÇALIŞMA ESASI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                     | Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu |                   |                                                                                                   |
| BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                     | Prof.Dr.Mehmet MELLİ                                                      |                   |                                                                                                   |

| Unvanı/Adı/Soyadı       | Uzmanlık Alanı                | Kurumu                  | Cinsiyet                                                         | Araştırma ile ilişkisi                                           | Katılım *                                                        | İmza |
|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------|
| Prof.Dr.Mehmet MELLİ    | Farmakoloji                   | A.Ü.Tıp Fakültesi       | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN | Gastroenteroloji              | A.Ü. Tıp Fakültesi      | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Mehmet GÜREL    | Genel Cerrahi                 | A.Ü. Tıp Fakültesi      | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY | Farmakoloji                   | A.Ü.Eczacılık Fakültesi | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Nuhan PURALI    | Biyofizik                     | H.Ü. Tıp Fakültesi      | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU   | Ruh Sağlığı ve Hastalıkları   | A.Ü. Tıp Fakültesi      | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK   | Biyokimya                     | A.Ü. Tıp Fakültesi      | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Serap SIVRI     | Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları | H.Ü. Tıp Fakültesi      | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK  | Hukuk                         | A.Ü.Hukuk Fakültesi     | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Banu ÇAKIR      | Halk Sağlığı                  | H.Ü. Tıp Fakültesi      | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Doç.Dr.Güngör UTKAN     | Tıbbi Onkoloji                | A.Ü. Tıp Fakültesi      | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Doç.Dr.Derya ÖZTUNA     | Biyoistatistik                | A.Ü. Tıp Fakültesi      | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY | Tıbbi Genetik                 | A.Ü. Tıp Fakültesi      | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Yrd.Doç.Dr.Volkan KAVAS | Tıp Tarihi ve Etik            | A.Ü. Tıp Fakültesi      | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |
| Gülsüm ASLAN            | Arkeoloji                     | -                       | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> |      |

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ASLI GİBİDİR

## EK-2

EK-2

### BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

**Araştırmanın Adı:** Prematür over yetersizliği olan hastalarda *BMP15* ve *FOXL2* geni mutasyon analizi

**Araştırmanın Kolay Anlaşılır Adı:** Erken menopoz tanısı ile izlenen hastalarda genetik olabilecek nedenlerin araştırılması

**Sorumlu Araştırmacı:** Yrd. Doç. Dr. Halil Gürhan Karabulut

Erken menopoz (tıp dilinde prematür over yetersizliği ya da kısaca POY olarak adlandırılmaktadır), 40 yaşın altındaki bayanlarda yumurtalığın çalışmamasına bağlı olarak adet kesilmesidir. Düzenli adet görmekte olan bir kadının 6 ay süreyle adet görmemesi ve sonrasında birer ay aralıklarla iki kez kanında bakılan hormon düzeylerinin 40 IU/L ve üzerinde saptanması erken menopoz olarak tanımlanır.

Erken menopoz iki önemli sonuca neden olmaktadır. Bunlardan birincisi kadınlık hormonu olarak da bilinen östrojen hormonunun normalden az olması, ikincisi de kısırlıktır. Bu hormonun azlığı kemik erimesi, kalp damar hastalıkları ve sinir sisteminde harabiyet riskini arttırmaktadır. Yumurtalık fonksiyonlarının erken kaybı ciddi sağlık sorunlarına neden olmakla beraber ölüm oranında da yaklaşık iki kat artış saptanmaktadır.

Bu çalışmamızda erken menopoz hastalarında bu durumun altında yatan nedenin bulunması ve kadınlara üreme hayatını erken planlama imkanının verilmesi amaçlanmaktadır. Çalışma sonucunda aile bireylerine ve hastaya genetik danışmanlık ve klinik gözlem hizmetinin verilmesi gerekebilmektedir.

Çalışmamıza erken menopoz tanısı alan ve bugüne kadar ki bilgilerimizle erken menopoza neden olabilecek en sık genetik nedenlere yönelik olarak yapılan test sonuçları normal bulunan hastalar alınacaktır.

Çalışmayı kabul etmeniz halinde sizden 5-10 ml periferik kan örneği alınacaktır. Kan örneği alınması sırasında iğne batmasına bağlı olarak bir miktar acı duyabilirsiniz. Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması ve enfeksiyon riski vardır. Çalışma kan örneklerinden elde edilen DNA'larda gerçekleştirilecek, ek bir girişim ya da doku alımı olmayacaktır.

Çalışma kapsamında gönüllülere herhangi bir ilaç verilmeyecektir. Bu çalışmaya katılan gönüllülerin tedavi ya da izlemine müdahale edilmeksizin kan örneklerinden çalışma yapılacak ve çalışmanın sonuçları kaydedilecektir. Bu bilgiler bilimsel amaçla kullanılacaktır. Bu çalışmaya katılan gönüllülerin sonuçları gerek görüldüğünde kendileri ve ilgili doktorlar ile paylaşılacaktır. Bu çalışma sırasında size yapılacak muayene, laboratuvar tetkiki vb. işlemler ücretsiz olup sizden veya bağlı bulunduğunuz sigorta kurumundan hiçbir ücret talep edilmeyecektir.

Çalışmaya bilgilendirme sonrasında katılmak isteyen hastalar dahil edilecektir. Mazeret bildirmeksizin çalışma olurunuzu geri alma hakkına sahipsiniz. Bundan dolayı sonraki takip ve tedavi haklarınızda kayba uğramanız söz konusu değildir.

## EK-2 (Devam)

Çalışma sonuçları gizlilik kurallarına uygun olarak saklanacak ve sonuçlar yayımlandığında kimlik bilgileriniz ve isminiz gizli tutulacaktır. Bu belgeyi imzalamanız sonucunda bu şartlar altında bilgilerinizin kullanılmasına izin vermektedir. Çalışma ile ilgili ayrıntılı bilgi almak istemeniz durumunda çalışmanın sorumlu yürütücüsü olan Yrd. Doç. Dr. Halil Gürhan Karabulut ya da yardımcı araştırmacı Dr. Mehmet Burak Mutlu'ya danışabilirsiniz.

Tel:

### GÖNÜLLÜ OLURU

Bu sayfayı imzalamakla gönüllü olarak prematür over yetersizliği olan hastalarda *BMP15* ve *FOXL2* mutasyonlarının araştırılması adlı çalışmaya katılmayı kabul etmiş olacağım konusunda bilgilendirildim. Yukarıda geçen bilgileri okudum. Aynı zamanda sözlü olarak bilgilendirildim. Bu şartlar altında bu çalışmaya katılmayı kabul ediyorum.

Alınan kan örneğinin aşağıdaki koşullar altında kullanılmasına izin veriyorum.

☐ Tarafımdan alınan kan örneğinin yalnızca bu çalışma için kullanılmasını onaylıyorum. İleride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

☐ Tarafımdan alınan kan örneğinin önerilen çalışma için kullanılmasını onaylıyorum. İlerde yapılması olası diğer çalışmalar için isminin belirtilmeden bilgilerimin kullanılmasını onaylıyorum.

☐ Tarafımdan alınan kan örneğinin gizlilik kurallarına uygun olarak kimlik bilgilerimin ve isminin gizli tutulması kaydıyla diğer çalışmalarda da kullanılmasını onaylıyorum.

|                                            |            |
|--------------------------------------------|------------|
| Gönüllünün adı soyadı:                     | Tarih: / / |
| Adres:                                     | İmza:      |
| Tel:                                       |            |
| Gönüllünün yasal temsilcisinin adı soyadı: | Tarih: / / |
| Adresi:                                    | İmza:      |
| Tel:                                       |            |
| Açıklamaları yapan kişinin adı soyadı:     | Tarih: / / |
|                                            | İmza:      |

Bu formun imzalı bir kopyası gönüllüye verilecek, bir kopyası araştırmacıda kalacaktır.