



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PREMATÜR OVARYUM YETMEZLİĞİ (POY) TANISINA
YÖNELİK MİKRODİZİN BAZLI KARŞILAŞTIRMALI
GENOMİK HİBRİDİZASYON KİTİ (MICROARRAY CGH)
GELİŞTİRİLMESİ**

**Candan EKER
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman
Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA
Dr. S. Hakkı KUMUŞOĞLU**

Aralık, 2010

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PREMATÜR OVARYUM YETMEZLİĞİ (POY) TANISINA
YÖNELİK MİKRODİZİN BAZLI KARŞILAŞTIRMALI
GENOMİK HİBRİDİZASYON KİTİ (MICROARRAY CGH)
GELİŞTİRİLMESİ**

Candan EKER
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA
Dr. S. Hakkı KUMUŞOĞLU

Aralık, 2010

İSTANBUL

Bu çalışma 17/02/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Ayşegül Topal Sankaya(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. A. Süha Yalçın
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Şule Arı
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Hande Çağlayan
Boğaziçi Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Filiz Aydın
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin “3057” numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu çalışmanın uygulama kısmı Medimiks Medikal Biyoteknoloji Ar-Ge/Üretim Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana ışık tutan, hiçbir konuda desteklerini esirgemeyen ve varlıklarıyla beni şanslı kılan danışman hocalarım sayın Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA'ya ve Medimiks Medikal Biyoteknoloji Ar-Ge/Üretim Laboratuvarı Medikal Direktörü sayın Dr. S. Hakkı KUMUŞOĞLU'na en içten dileklerimle teşekkürü borç bilirim.

Lisans eğitimimden bu yana bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, akademik yolda ilerlememi teşvik eden, içtenliklerini her zaman hissettiğim değerli hocalarım Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Prof. Dr. Avni KURU'ya, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanlarından Prof. Dr. Güler TEMİZKAN'a ve bölümdeki hocalarımın herbirine saygılarımı sunarım.

Eğitim hayatım boyunca görüş ve isteklerime saygı gösterip beni her koşulda destekleyen, sevgilerini benden esirgemeyip bugünlere gelmemi sağlayan, başarımın sessiz kahramanları annem Zekiye EKER ve babam Saim EKER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık, 2010

Candan EKER

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖZET	x
SUMMARY.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. PREMATÜR OVARYUM YETMEZLİĞİ (POY)	4
2.2. FOLİKÜLOGENEZ	7
2.2.1. Folikülogenezde Gelişim Aşamaları	8
2.2.2. Hormonal Fonksiyon	9
2.3. POY NEDENLERİ (ETİYOLOJİSİ)	12
2.3.1. İyatrojenik POY (cerrahi, kemoterapi, radyoterapi).....	12
2.3.2. Otoimmün POY.....	13
2.3.3. Galaktozemi.....	14
2.3.4. Enzim Eksiklikleri.....	15
2.3.5. Gonadotropin ve Gonadotropin Reseptör Bozuklukları.....	15
2.3.6. Kromozomal ve Genetik Bozukluklar.....	16
2.4. POY GENETİĞİ.....	17
2.4.1. Dişi Fertilitisini Etkileyen Yapısal X Kromozomu Değişiklikleri.....	18

2.4.1.1. <i>POF1</i> Bölgesi (<i>Xq26.2-q28</i> , OMIM: 311360).....	19
2.4.1.2. <i>POF2</i> Bölgesi (<i>Xq13.3-q22</i> , OMIM: 300511).....	24
2.4.2. TGF- β (Transforming Growth Factor- β) Gen Ailesi.....	27
2.4.3. POY Sendromunda Diğer Önemli İnsan Folikülogenez Genleri.....	30
2.5. ARRAY-TEMELLI CGH (ACGH) TEKNOLOJISI.....	35
2.5.1. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH) Yöntemi.....	36
2.5.2. Array CGH Yöntemi.....	38
2.5.3. Kopya Sayısı Değişiklikleri, “CNV” (Copy Number Variations).....	40
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	41
3.1. POY TANISINA YÖNELİK MİKRODİZİN BAZLI KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYON KİTİ TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ.....	42
3.1.1. Kullanılan Hücre Soyu ve Genomik Klonların Temini.....	42
3.1.2. BAC / PAC Klonlarının Kopyalanması.....	45
3.1.3. Hücrelerin Zengin Besiyeri Ortamına Alınması.....	45
3.1.3.1. 2 ml lik Kültür Hazırlığı (<i>Maxi prep.</i>).....	45
3.1.3.2. Hücrelerin Zengin Ortamdan Eldesi.....	46
3.1.4. BAC / PAC Klonlarından Plazmit DNA İzolasyonu.....	46
3.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	47
3.1.6. BAC / PAC Plazmit DNA sının Çoğaltılması.....	48
3.1.7. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	49
3.1.7.1. DNA Konsantrasyonunun Spektrofotometrik Tayini.....	49
3.1.7.2. DNA Konsantrasyonunun Florometrik Tayini.....	49
3.1.8. Mikroarray Basımı İçin Optimum DNA Konsantrasyonu ve Spotlama Tamponunun Belirlenmesi.....	50
3.1.9. Mikroarray Lamına Basılan Spotların Kontrolü.....	51
3.1.10. Mikroarray Lamında Çift İplikli DNA (dsDNA) Kontrolü.....	51
3.1.11. Mikroarray Lamındaki DNA nın Denatürasyon Kontrolü.....	52
3.1.12. Hedef DNA ların Mikroarray Lamına Basılması.....	52
3.2. POY TANISINA YÖNELİK GELİŞTİRİLEN MİKRODİZİN BAZLI KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYON KİTİ KULLANILARAK MİKROARRAY CGH ÇALIŞMA PROTOKOLÜNÜN OPTİMİZASYONU..	52
3.2.1. Referans DNA Örneklerinin Restriksiyon Enzimiyle Kesimi.....	52
3.2.2. DNA Örneklerinin Saflaştırılması.....	53
3.2.3. Kesime Uğratılmış Referans DNA ların Farklı Renkteki Florokromlarla İşaretlenmesi.....	54
3.2.4. İşaretlenmiş DNA ların Çöktürülmesi.....	55
3.2.5. İşaretlenmiş DNA nın Mikroarray Üzerinde Hibridizasyonu.....	56

3.2.6. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Protokolü.....	56
3.2.7. Tarayıcı ve Yazılım Kullanılarak Mikroarray Lamalarının Taranması ve Analizi.....	57
3.3. POY TANISI ALMIŞ HASTA ÖRNEĞİNİN GELİŞTİRİLEN MİKROARRAY KİTİNDE UYGULANMASI.....	57
3.3.1. Test (hasta ya da kontrol) Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu.....	57
3.3.2. Test ve Referans DNA Örneklerinin Fragmentasyon Optimizasyonu.....	58
3.3.2.1. Test ve Referans DNA Örneklerinin Restriksiyon Enzimiyle Kesimi.....	58
3.3.2.2. Kesime Uğratılmış Test ve Referans DNA Örneklerinin Saflaştırılması.....	59
3.3.2.3. Test ve Referans DNA ların Farklı Renkteki Florokromlarla İşaretlenmesi.....	59
3.3.2.4. Test ve Referans DNA sının Dejenere Oligonukleotid PCR (DOP-PCR) Yöntemiyle Çoğaltılıp, Farklı Renkteki Florokromlarla İşaretlenmesi.....	59
3.3.3. İşaretlenmiş DNA ların Çöktürülmesi.....	60
3.3.4. İşaretlenmiş DNA nın Mikroarray Üzerinde Hibridizasyonu.....	61
3.3.5. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Protokolü.....	61
3.3.6. Tarayıcı ve Yazılım Kullanılarak Mikroarray Lamalarının Taranması ve Analizi.....	61
4. BULGULAR.....	62
4.1. POY TANISINA YÖNELİK MİKRODİZİN BAZLI KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYON KİTİ TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ....	62
4.1.1. BAC / PAC Klonlarının Üretilmesi.....	62
4.1.2. BAC / PAC Klonlarından Plazmit DNA İzolasyonu.....	63
4.1.3. BAC / PAC Plazmit DNA sının Çoğaltılması.....	63
4.1.4. DNA Konsantrasyonunun Florometrik Tayini.....	64
4.1.5. Mikroarray Basımı İçin DNA Konsantrasyonu Optimizasyon Sonuçları.....	65
4.1.5.1. DNA Konsantrasyonu ve Spotlama Tamponu Optimizasyonu Sonuçları.....	65
4.1.5.1.1. Mikroarray Lamında Çift İplikli DNA (dsDNA) Kontrolü.....	67
4.1.5.1.2. Mikroarray Lamına Basılacak DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	68
4.2. POY TANISINA YÖNELİK MİKRODİZİN BAZLI KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYON KİTİ ÜRETİMİ.....	70
4.2.1. BAC / PAC Klonlarının Kopyalanması.....	70
4.2.2. BAC / PAC Klonlarından Plazmit DNA İzolasyonu.....	71
4.2.3. BAC / PAC Plazmit DNA'larının Çoğaltılması.....	73
4.2.4. DNA Konsantrasyonunun Florometrik Tayini.....	76
4.2.5. DNA Konsantrasyonunun Eşitlenmesi.....	77
4.2.6. Mikroarray Lamalarının Üretilmesi.....	80
4.2.7. Üretimi Yapılan Mikroarray Lamında aCGH Çalışması.....	82
4.2.8. Array CGH Çalışılmış Mikroarray Lamının Mikroarray Tarayıcıda	

Analizi.....	84
4.2.9. Geliştirdiğimiz Kit Bileşenleri ve aCGH Protokolünün Başka Bir Marka Ticari Arrayde Denenmesi.....	86
4.2.10. POY Tanısına Yönelik Geliştirilen “Prototip” Kit Bileşenleri.....	89
4.2.10.1. Metodoloji.....	89
4.2.10.2. Kit İçeriği.....	89
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	90
KAYNAKLAR.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	122

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Yumurtalıktaki folikül gelişimi.....	8
Şekil 2.2	: Ovaryum yapısı.....	9
Şekil 2.3	: Folikülogenez düzenlenmesinde rol alan pozitif ve negatif feedback yolu.....	10
Şekil 2.4	: İnsan X kromozomuna ait G-Bantlı yapısal görünüm.....	17
Şekil 2.5	: Normal, premutasyonlu ve tam mutasyonlu bireylerde <i>FMRI</i> gen anlatım modelleri.....	22
Şekil 2.6	: Hasta BC'ye ait metafaz örneğinde FISH uygulaması.....	25
Şekil 2.7	: Foxo3a mutant ve normal farelere ait yumurtalıklar.....	34
Şekil 2.8	: Geleneksel Sitogenetik ve Moleküler Sitogenetik yöntemlerin karşılaştırılması.....	36
Şekil 2.9	: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH).....	37
Şekil 2.10	: A. BAC/PAC array üretimi, B. Üretimi yapılan arrayde aCGH çalışması.....	39
Şekil 3.1	: A.pBACe3.6 vektörü, B.pCYPAC2N vektörü, C.pPAC4 vektörü.....	44
Şekil 4.1	: Kültür ortamında üretilen BAC / PAC klonlarına ait pelletlerin santrifügasyonla eldesi.....	62
Şekil 4.2	: BAC / PAC klonlarına ait plazmit DNA larının %1 (w/v) lik agaroz jeldeki görünümleri.....	63
Şekil 4.3	: Çoğaltılan BAC / PAC plazmit DNA larının %1 (w/v) lik agaroz jeldeki görünümleri.....	64
Şekil 4.4	: Picogreen yöntemiyle DNA konsantrasyonunun belirlenmesi.....	65
Şekil 4.5	: Mikroarray lamalarının mikroarray tarayıcıda taranan görüntüleri.....	66
Şekil 4.6	: Mikroarray lamında çift iplikli DNA varlığının tespiti.....	67
Şekil 4.7	: Cy3 ve Cy5 ile işaretlenmiş sağlıklı kadın ve erkek DNA'sıyla melezleme sonucu optimum DNA konsantrasyonunun belirlenmesi.....	68
Şekil 4.8	: BAC / PAC klonlarının çoğaltılması.....	71
Şekil 4.9	: BAC / PAC klonlarına ait plazmid DNA larının %1 (w/v) lik agaroz jeldeki görünümleri.....	73
Şekil 4.10	: Çoğaltılan BAC / PAC Plazmit DNA larının %1 (w/v) lik agaroz jeldeki görünümleri.....	75
Şekil 4.11	: Total genom amplifikasyonu yapılmış DNA örneklerinin Picogreen yöntemiyle konsantrasyonunun hesaplanması.....	77
Şekil 4.12	: 3000 ng/ml 100 µl lik stok hazırlanması.....	78
Şekil 4.13	: 1000 ng/ml 50 µl hacimde 384 kuyucuklu mikropalakda spotlama öncesi yerleşim planı.....	79
Şekil 4.14	: Mikroarray lamalarının üretim aşaması.....	80
Şekil 4.15	: Dörtlü kopya halinde basımı gerçekleştirilen mikroarray lamnda basım sonrası tarayıcıda spot kontrolü.....	81

Şekil 4.16	: Test ve referans DNA'larının POY için üretilen mikroarrayde hibridizasyonu.....	83
Şekil 4.17	: Mikroarray lamının hibridizasyon sonrası mikroarray yazılım programıyla analizi.....	85
Şekil 4.18	: Test ve referans DNA'larının ticari mikroarrayde hibridizasyonu. A. aCGH çalışılmış mikroarray lamının hibridizasyon sonrası genel görünümü, B. Cy3-dUTP (kırmızı) ve Cy5-dUTP (yeşil) ile işaretlenmiş test ve referans DNA'nın mikroarray üzerinde hibridizasyonu.....	88
Şekil 4.19	: POY tanısına yönelik geliştirilen prototip mikroarray CGH kiti...	89

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	: POY'a özgü aCGH kit geliştirilmesine yönelik çalışma planı.....	41
Tablo 3.2	: BAC ve PAC klon koleksiyonunun oluşturulmasına ait genel bilgi..	42
Tablo 3.3	: Hücre kültüründe kullanılan besiyeri ve solüsyonlar.....	46
Tablo 3.4	: DNA izolasyonu için kullanılan tampon ve solüsyon içerikleri.....	47
Tablo 3.5	: Agaroz jel için tampon içeriği.....	48
Tablo 3.6	: GenomiPhi V2 DNA Amplifikasyon Kiti içeriği.....	49
Tablo 3.7	: BAC / PAC Plazmit DNA'sının çoğaltılmasında kullanılan PCR programı.....	49
Tablo 3.8	: Standart eğri oluşturma protokolü.....	50
Tablo 3.9	: <i>Hind</i> III Restriksiyon Enzimiyle DNA kesim reaksiyonu.....	53
Tablo 3.10	: "BioPrime® DNA Labeling System" ile işaretleme reaksiyonu.....	55
Tablo 3.11	: Hibridizasyon sonrası yıkama aşamasında kullanılan solüsyonlar....	57
Tablo 3.12	: DOP-PCR ile DNA çoğaltımında kullanılan PCR programı.....	60
Tablo 4.1	: POY'a özgü mikroarray CGH kiti tasarımı ve geliştirilmesinde optimizasyon sonuçları.....	69

SEMBOL LİSTESİ

EtBr	: Etidyum bromür
g	: gram
µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre
mg	: miligram
ml	: mililitre
mM	: milimolar
M	: Molarite
Ng	: nanogram
Φ	: Phi
pg	: pikogram
°C	: Santigrat derece
cy3	: cyanine-3 (siyanin-3)
cy5	: cyanine-5 (siyanin-5)
u	: ünite
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
w/v	: ağırlık/hacim
v/v	: hacim/hacim

ÖZET

PREMATÜR OVARYUM YETMEZLİĞİ (POY) TANISINA YÖNELİK MİKRODİZİN BAZLI KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYON KİTİ (MICROARRAY CGH) GELİŞTİRİLMESİ VE ÜRETİMİ

Prematür ovaryum yetmezliği (POY), 40 yaş altı kadınlarda altı aydan uzun süreli, serumda artmış gonadotropin ve 40 U/L'den yüksek folikül uyarıcı hormon (FSH) varlığında ortaya çıkan erken adet kesilmesi şeklinde tanımlanır. POY'un sonucu olan dişi kısırlığı (infertilitesi) günümüzde düzeltilemez bir durumdur. POY ve uzun süreli östrojen eksikliği osteoporozun erken ortaya çıkmasına yol açabilir. Ailesel POY'un erken tanısı menopozun önceden tahmin edilmesine fırsat verip, embriyoların dondurulması ya da daha önceden çocuk sahibi olma gibi üremeye ilgili seçeneklere olanak tanıyacaktır. POY sendromu, insanda folikül oluşumunu kontrol eden birden fazla genin etkili olduğu kompleks heterojenik klinik bir hastalıktır. Deneysel çalışmalardan elde edilen bilgilere göre bu genlerin dişi eşey kromozomunda *POF1* (Xq26.2-q28) ve *POF2* (Xq13.3-q22) lokuslarında kümelenmiş olabileceği tahmin edilmektedir. *POF1* lokusunda *FMRI*, *HS6ST2*, *TFDP3*, *GPC3* ile *POF2* lokusunda *DIAPH2*, *DACH2*, *POF1B* genleri POY aday genleri olarak tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra *AIRE*, *DAZL*, *FOXL2*, *FSHR*, *GALT* ve *TGF-β* gen ailesi üyelerinden *GDF9*, *INHα* gibi otozomal kromozomlarda taşınan genlerdeki mutasyonların da POY'da rolü olduğu düşünülmektedir. Günümüzde hem daha hızlı sonuç alınabilen, hem de analiz aşamasının tam otomatik olarak gerçekleştirilebildiği "MicroArray" CGH yöntemi araştırmacıların çalışmalarını yoğunlaştırdıkları bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntem ile tüm genom düzeyinde kromozomal kayıp ya da artışların yüksek çözünürlükte, kısa bir sürede analizi mümkün kılınmaktadır.

Bu tez çalışmasında, POY'a neden olan aday genlerin bulunduğu X ve otozomal kromozomlar üzerindeki lokusları çoklu kopyalar şeklinde içeren "microarray" CGH geliştirilerek POY'a özgün ve mevcut teknolojilere nazaran daha hassas, kolay uygulanabilir, hızlı ve düşük maliyetli bu yöntemin, yaygın olarak uygulanabilmesine katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, 393 "Bakteriyal Yapay Kromozom" (BAC) ve 20 "P1 fajı türevli Yapay Kromozom" (PAC) olmak üzere toplam 413 klona ait DNA bölgesini dörtlü kopya içerecek şekilde tasarlanmış, kontrol bölgeleriyle birlikte toplam 1824 spot içeren POY'a özgü mikroarray lamalarının üretimi gerçekleştirilmiştir.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF CGH BASED MICROARRAY KIT INTENDED FOR DIAGNOSIS OF PREMATURE OVARIAN FAILURE (POF)

Premature ovarian failure (POF) is defined as amenorrhoea for more than six months in the presence of elevated gonadotropins and FSH serum level higher than 40 U/L, occurring before the age of 40. Female infertility is presently an irreversible consequence of POF. POF and prolonged estrogen deficiency may lead to the early onset of osteoporosis. The early diagnosis of familial POF will provide the opportunity to predict the likelihood of early menopause, and allow other reproductive choices to be made, such as freezing embryos or having children earlier. Premature Ovarian Failure (POF) syndrome is a very heterogeneous clinical disorder due probably to complex genetic networks controlling human folliculogenesis. Some experimental evidence suggests that these genes might be clustered on the female sex chromosome in the *POF1* (Xq26.2-q28) and *POF2* (Xq13.3-q22) loci. The genes such *FMRI*, *HS6ST2*, *TDPF3*, *GPC3* in *POF1* locus and *DIAPH2*, *DACH2*, *POF1B* in *POF2* locus were identified as POF candidate genes. However, mutations on some autosomal genes like *AIRE*, *DAZL*, *FOXL2*, *FSHR*, *GALT* and *GDF9*, *INH α* members of *TGF- β* gene family are also estimated to play a role in POF pathology. Currently, “Microarray” CGH appears as a current method of investigation for mutation analysis of genes. Also, the results can be taken more rapidly and analysis phase can be performed full automatically with this method. “Microarray” CGH approach enables the analysis of whole genome range chromosomal losses or gains in a short time and with high-resolution.

In the current study, it is aimed to develop a “microarray” CGH including multiple copies of POF candidate genes that exist on the X and autosomal chromosomes. Thus, it can be contributed prevalent applicability of this method which is more sensitive, simple applied, fast and low cost according to the existing technologies. For this purpose, we have designed a POF-specific microarray kit which consists of 413 genomic clones (393 “Bacterial Artificial Chromosomes” (BACs) and 20 “P1 derived Artificial Chromosomes” (PACs)) spotted in four copies that contains totally 1824 spots with control regions for the each array slide.

1. GİRİŞ

Menopoz Yunanca'da ay (men) ve sonlanma (pause) kelimelerinden türemiş olup, sözlük anlamı "son adet"tir. Adet kanamalarının kesin olarak bitmesi anlamına gelmektedir (Yıldırım, 1996; Ertüngealp ve Seyisoğlu, 2000).

Menopoz; kadın yaşam döngüsünde üreme yeteneğinin sona ermesiyle karakterize olan önemli bir aşamadır. Ovaryumdaki foliküler fonksiyonun kaybıyla birlikte menstruasyonun kalıcı olarak sona ermesidir. Kadın sağlığını biyolojik, psikolojik ve sosyal yönden etkiler (Durmaz, 2005).

Menopoz, genel bilinenin aksine rahimin değil yumurtalıkların işlevinin sona ermesidir. Yumurtalıklarda yeni yumurta oluşumu gerçekleşmemekte ve hormon üretimi yapılamamaktadır. Yeterince östrojen ve progesteron hormonları üretiminin olmamasına bağlı olarak adetten kesilme gerçekleşmektedir.

ABD'de kadınların ortalama menopoz yaşı 51.4'tür ve standart sapma 3.8 yıldır. Menopoz yaşı; ırk, sosyo-ekonomik durum, gebelik sayısı, oral kontraseptif kullanımı, eğitim, fiziksel özellikler, alkol tüketimi, menarş yaşı veya son gebeliğin tarihinden etkilenmemektedir. Sadece sigara içiminin kesin biçimde folikül tükenmesini hızlandırdığı saptanmıştır (Dechanet ve diğ., 2010).

Türk toplumunda ise menopoz yaşı 46-48 olarak bildirilmektedir. Türkiye Menopoz Derneği tarafından ülkemiz genelindeki menopoz merkezlerinden elde edilen verilere bakıldığında, Türkiye'deki menopoz yaşının 46.7 olduğu anlaşılmaktadır.

Adetten kesilme 40 yaşından erken gerçekleşmişse "erken menopoz" olarak tanımlanmaktadır. Tıbbi literatürde "prematür menopoz" olarak da adlandırılmaktadır.

Menopozun 30 yaşından daha erken ortaya çıkması durumuna ise "Prematür Ovaryum Yetmezliği (POY)" adı verilir. Bu şekilde yumurtalıkların çok erken dönemde tükenmesi kadınlarda psikolojik ve fizyolojik yönden pek çok problemi de beraberinde getirir.

Menopozun laboratuvar yönünden tanımlanması için kanda Folikül uyarıcı hormon (FSH), Luteinleyici hormon (LH) ve östrojen hormonları değerlerine bakılır. FSH ve LH artmış, östrojen azalmışsa bu durum yumurtalıkların tükendiğini göstererek menopoz tanısını koydurur (Burger, 1994).

Prematür ovaryum yetmezliği (POY), mutlaka nedenlerin araştırılması ve uygun tedavilerin başlanmasını gerektiren bir durumdur. Erken menopoz ve prematür ovaryum yetmezliği ile ilgili olarak pek çok neden ortaya sürülmekle birlikte, menopozun yaşını neyin belirlediği konusunda kesin bir görüş yoktur. Ailesel (kalıtsal) özellikler, bir takım otoimmün hastalıklar (Cushing sendromu, tiroid hastalıkları, SLE gibi), sigara, stres, kanser tedavileri, diabet (şeker hastalığı) ve genetik (kromozomal) problemler sebep olarak ortaya sürülmüştür (Buckler, 2005 derlemesinden alınmıştır).

Prematür ovaryum yetmezliği, 40 yaşın altındaki kadınlarda "hipergonadotropik hipogonadizm" (yumurtalığın çalışmamasına bağlı FSH hormonunun kanda artması) gelişmesine bağlı olarak adet kesilmesidir. Tanısı ise en az 3 aylık oligo-amenore (adetin seyrelmesi ya da kesilmesi) durumu ile en az 2 kez yapılan ölçümlerde FSH hormon düzeyinin menopoz değerlerinde çıkması ile konulur. Tanının doğruluğu önemlidir; çünkü bu durum ovaryum fonksiyonlarının kalıcı olarak kesilmesini ifade eder (Günyeli, 2009 derlemesinden alınmıştır). Gerçekte POY'lu kadınlar tanıdan itibaren 10 yıllık süre içerisinde aralıklı ovaryum fonksiyonu gösterebilirler (Nelson ve diğ., 2005). Öyleki tanıdan sonraki yıllarda bazı kadınlarda gebelik dahi gerçekleşebilmektedir (van Kasteren ve Schoemaker, 1999). Bu durum tıbbi, ilk olarak 1942 yılında Fuller Albright tarafından, "primer ovaryan yetmezlik" adı ile tanıtılmıştır (Albright ve diğ., 1942).

POY sendromu, insanda folikül oluşumunu kontrol eden birden fazla genin etkili olduğu kompleks heterojenik klinik bir hastalıktır (Fassnacht, 2006).

Array-temelli karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (array CGH), kromozomal dengesizliklerin yüksek çözünürlükte belirlenmesine olanak tanıyan güçlü, yeni bir teknolojidir. Farklı işaretlenmiş test ve kontrol DNA'larının genomik klonları içeren bir mikroarray üzerine birlikte hibridize edildiği bir yöntemdir.

Bu tez çalışmasında, POY'a neden olan aday gen ve gen dışı bölgelerin bulunduğu X ve otozomal kromozomlar üzerindeki lokusları çoklu kopyalar şeklinde içeren "microarray" CGH geliştirerek POY'a özgün ve mevcut teknolojilere nazaran daha hassas, kolay uygulanabilir, hızlı ve düşük maliyetli bu yöntemin, yaygın olarak uygulanabilmesine katkıda bulunulması amaçlanmaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PREMATÜR OVARYUM YETMEZLİĞİ (POY)

Prematür ovaryum yetmezliği (POY) ilk kez 1930 yılında, adet gecikmesi ve üriner gonadotropin seviyelerinde meydana gelen artış olarak tarif edilmiştir (Coulam ve diğ., 1986). Bu tablo önceleri 40 U/L'nin üzerinde FSH seviyeleri ile ovaryumda primordiyal folikül yokluğu ve kalıcı sterilite olarak tanımlanmıştır (Atria, 1950; Goldenberg, 1973). Ancak sonraki yıllarda yapılan çalışmalar bu tanımlamayı değiştirmiştir. Rebar ve diğ. (1990) tarafından yapılan çalışmada, 26 POY'lu hastanın dokuzunda folikül fonksiyonu gözledikleri, bunlardan beşinde ovülasyon ve bir hastada ise gebelik olduğu bildirilmiştir.

Prematür ovaryum yetmezliği (POY), 40 yaşından önce adet kesilmesi ya da bir toplumdaki ortalama menopoza yaşından 2 standart sapma daha genç bir yaşta adet görmeme, cinsiyet hormonlarında azalma ve hipofizdeki gonadotropin adı verilen hormonlarda artma olarak tanımlanır (Mercan, 2005). POY, hiç adet görmeme şeklinde görülebileceği gibi (primer amenore), ergenlik sonrası belirli bir süre adet gördükten daha sonraki bir dönemde de ortaya çıkabilir (sekonder amenore) ve 40 yaşın altındaki kadınların % 1'inde görülür (Coulam ve diğ., 1986).

Prematür ovaryum yetmezliği (POY) gibi ovaryum foliküllerinin tükenmesinden kaynaklanan erken menopoza ve dişi kısırlığı, kadınları etkileyen en yaygın kronik medikal koşullar arasında yer alır. Amerika Birleşik Devletlerinde dişi kısırlığı oranı % 13 olup, ovaryum fonksiyon bozukluğu bunun altında yatan en yaygın nedeni oluşturmaktadır (Kumar ve diğ., 2007).

POY olan genç kadınlarda, cinsiyet steroidlerinin eksikliği, doğal olarak menopoza giren kadınlarda olduğundan daha uzun sürer. Bunun sonucunda da, bu kadınlarda osteoporoz riski anlamlı derecede artmaktadır (Ohta ve diğ., 1996; Anasti ve diğ., 1998). Spontan POY gelişen ve karyotip olarak normal olan kadınların üçte ikisinde kemik mineral yoğunluğu (BMD),

aralıklarla da olsa standart hormon tedavisi görmüş olan kadınlarda bile, kendi yaş gruplarındaki sağlıklı kadınlarınkinden 1 standart sapma daha aşağıdadır (Anasti ve diğ., 1998a).

Spontan POY'un yaş ile ilişkili insidansı (sıklığı) 20 yaş için 1 / 10.000 iken, 30 yaş için 1 / 1.000 ve 40 yaşındaki kadınlar için de 1 / 100 olarak gözlenir (Coulam ve diğ., 1986). Ailesel POY, tüm POY vakalarının % 4-31'ini temsil etmektedir (Torgerson ve diğ., 1997). Mozaizm olan olgularda fonksiyon gösteren bir miktar gonad dokusu mevcuttur. Buna bağlı olarak, bu olgularda değişen derecelerde cinsel gelişim ve geçici menstrual sikluslar görülebilir (Meskhi ve Seif, 2006).

POY, epidemiyolojide primer amenore (hiç adet görmemiş) vakalarının % 10-30'undan ve sekonder amenore (sonradan adeti kesilenler) vakalarının % 5-20'sinden sorumludur. Ancak POY'lu kadınların % 90'ında sekonder amenore mevcut iken sadece % 10'unda primer amenore mevcuttur. POY'lu hastalarda tanıdan yıllarca sonra bile % 5-10 oranında spontan gebelik şansı mevcuttur (Günyeli, 2009 derlemesinden alınmıştır).

Kadında POY'a doğru bir gidişe işaret eden spesifik uyarıcı bulgular bugüne kadar tanımlanmamıştır. Ancak hastaların yaklaşık olarak % 50'sinde, "prodromal POY" olarak adlandırılan bir oligoamenore ya da disfonksiyonel uterus kanaması öyküsü vardır. Olguların dörtte birinde ise, akut olarak ortaya çıkan amenore, gebelik ve doğumla ya da oral kontraseptif hapların bırakılması ile ilişkilendirilmiştir (Nelson ve diğ., 1996).

Yumurtalık, üreme organı olmasının yanı sıra bir endokrin organıdır. Ovaryum yetmezliği sistemik etkileri olan hormonal kusurlara yol açar ve hipotiroidizm, adrenal yetersizlik gibi diğer endokrin kusurlarıyla bağlantılı olabilir. Dişi kısırlığının galaktozemi (Kaufman ve diğ., 1979) ya da folikül uyarıcı hormon (FSH) reseptöründeki mutasyonlar (Aittomaki ve diğ., 1995) gibi metabolik ve genetik nedenleri bilinmesine rağmen; primer amenore, prematür ovaryum yetmezliği ve polikistik ovaryum hastalığını içeren dişi kısırlık sendromlarının etiyolojisi çok fazla bilinmemektedir. Bu bozuklukların ovaryum temelli önemli bir kalıtsal unsur olduğuna inanılmaktadır (Kumar ve diğ., 2007).

Ovaryum yetmezliğinin ergenlik sonrası ortaya çıkışı, prematür folikül kaybı ve folikülogenezin durmasıyla ilişkili olan sekonder amenore ile karakterizedir (Santoro, 2003). Fizyolojik menopoza durumunda olduğu gibi POY’da da çarpıntı, sıcak basması, yüzün kızarması, gece terlemesi, anksiyete, depresyon, uyku bozukluğu, halsizlik gibi klinik belirtiler gözlenir (Peccoz ve Persani, 2006).

Spontan POY, ovaryum yetmezliğinin kemoterapi, radyoterapi ya da cerrahi yollarla gerçekteşmediği anlamına gelir. Spontan POY hastasındaki herhangi bir genetik mekanizma ailesel etkiye (kalıtsal) sahip olabilir (Krauss ve diğ., 1987). Ayrıca, ovaryum yetmezliği olan kadınların % 4’ünde saptanan hastalık otoimmün nedeni (“steroidogenic cell autoimmunity”), bazı durumlarda da POY’un başlangıç unsuru olabilen otoimmün poliglandular yetmezlik sendromunun belirlenmesi kritik öneme sahiptir (LaBarbera ve diğ., 1988).

Ailesel POY’un erken tanısı menopozun önceden tahmin edilmesine fırsat verip, embriyoların dondurulması ya da daha önceden çocuk sahibi olma gibi üremeye ilgili seçeneklere olanak tanıyacaktır. POY birikerek artan negatif etkilere sahip olduğundan erken tanı, uygun stratejiyi başlatma ve risk azaltımı açısından klinisyenler için önemlidir (Peccoz, 2006 derlemesinden alınmıştır).

Ailesel POY’un, X kromozomundaki yapısal bir anormallikle sonuçlandığı durumlarda karyotip analiziyle değerlendirilebilir (Krauss ve diğ., 1987). Ailesel POY, Frajil X Mental Retardasyon genindeki (*FMRI*) premutasyonlarla da meydana gelebilir, bu durumun klinik olarak spesifik testi mevcuttur (Marozzi ve diğ., 2000). Frajil X premutasyonu anormal bir fenotipik karakterle ilişkili olmadığından, premutasyon taşıyıcılarının saptanması direkt genotip analiziyle belirlenebilmektedir (Oberle ve diğ., 1991; Rousseau ve diğ., 1991).

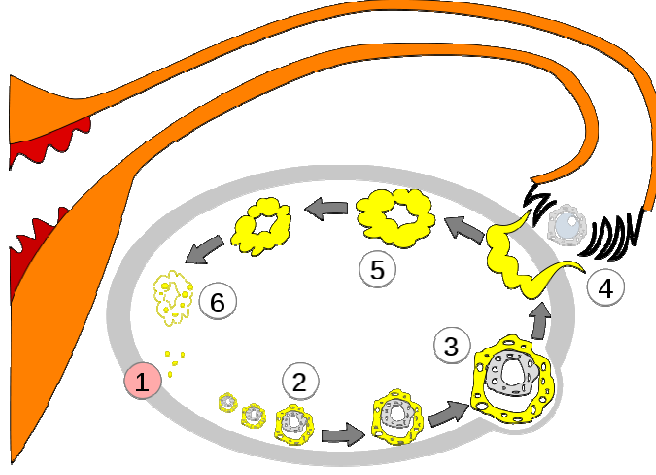
Ailesel POY hikayesi olanlara ilave olarak, ailesinde açıklanamamış mental reterdasyon, gelişim geriliği, demans, tremor/ataksi sendromu hikayesi olan kadınlarında genetik danışma alması önerilmektedir. Ailesel prematür ovaryum yetmezliğinin FSH reseptöründeki mutasyonlar gibi sık rastlanmayan genetik nedenlerinin belirlenmesine yönelik klinikte rutine girmiş genetik test bulunmamaktadır (Aittomaki ve diğ., 1995). Bahsedilen konularda ailesel hikayesi olmayan POY'lu kadınlar için uygun genetik değerlendirmeyi belirleyebilecek zarar / yarar analizi günümüzde mevcut değildir.

X kromozomundaki yapısal bozukluklar ailenin diğer üyelerini de etkileyebilir, fakat klinik test pahalı olmakla birlikte aile hikayesi yokluğunda verim düşük olabilmektedir. Spontan POY'lu kadınların yaklaşık % 6'sı *FMRI* geninde premutasyon taşır ve aile hikayesi olanlarda risk daha da artar (Marozzi ve diğ., 2000b).

Klinik açıdan testosteron kusurlu POY'lu kadınlarda bu durumun önemi açıklığa kavuşturulamamıştır (Doldi ve diğ., 1998). Prematür ovaryum yetmezliği olan genç kadınlarda kuru göz sendromu oranında artış olduğu açığa çıkarılmış, fakat mekanizması henüz anlaşılamamıştır (Shaw-Smith ve diğ., 2004).

2.2. FOLİKÜLOGENEZ

Folikülogenez, folikül olgunlaşması sürecidir ve olgunlaşmamış oosit içeren somatik hücrelerin yoğun bir şekilde paketlenmesi olarak da tanımlanır (Zuckerman, 1951; Zuckerman ve Baker, 1977). Bir kısım küçük primordiyal foliküllerin menstrual siklusa girecek olan ovulasyon öncesi foliküllere (preovulator folikül) gelişmesini açıklar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Yumurtalıktaki folikül gelişimi (Shazz, 2006).

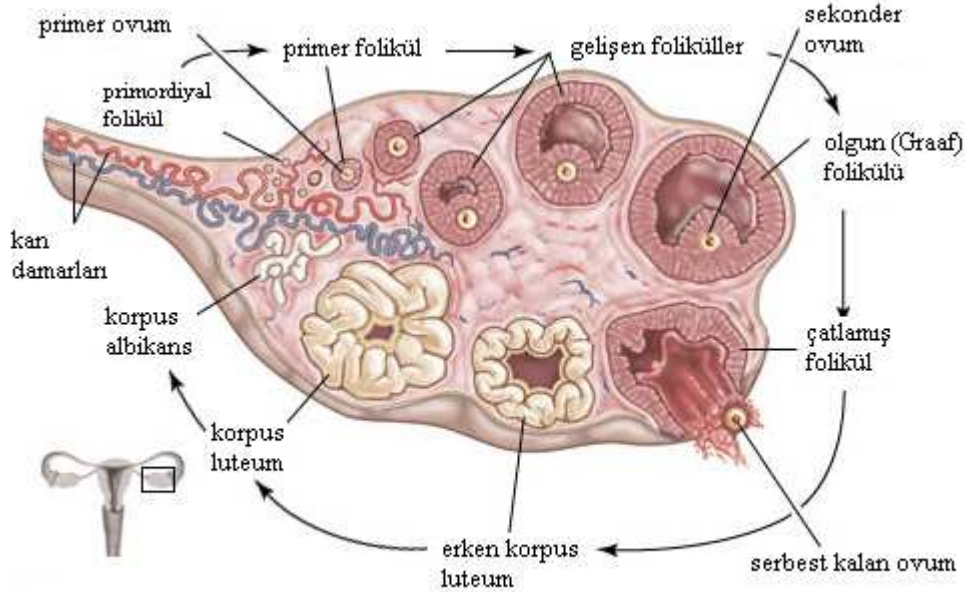
1. Menstruasyon 2. Folikül gelişimi 3. Olgunlaşmış folikül 4. Ovulasyon
5. Korpus luteum 6. Korpus albicans (korpus luteumun bozulması)

Erkeklerde sürekli devam eden spermatogenezin aksine folikülogenez, yumurtalıklarda var olan foliküllerin olgunlaşma aşamasında hormonal değişimleri cevaplamada yetersiz kaldığı durumda sonlanır. Folikül kaynağındaki bu azalma, menopozun başlangıcını işaret eder.

2.2.1. Folikülogenezde Gelişim Aşamaları

Folikülün primer rolü oosit taşımasıdır. İnsan, yumurtalıklarında belirli sayıda olgunlaşmamış primordiyal foliküllerle doğar. Bu foliküller de olgunlaşmamış benzer primer oositleri içerir. Folikülün tutulmasıyla folikülogenez başlar ve oositin folikülden ayrıldığı süreç olan ovulasyon ya da ölümle sonuçlanan büyüme periyoduna girer. Doğum sırasında yaklaşık 1×10^6 olan folikül sayısı, ergenlikte 3×10^5 e kadar azalır. Bu azalma erişkinlikte menopozun başladığı 50'li yaşlara kadar devam eder (Richardson ve diğ., 1987).

Folikülogenez yaklaşık olarak 375 gün sürer ve 13 menstrual siklusla aynı zamanda meydana gelir. Süreç sürekli devam eder, bunun anlamı yumurtalık herhangi bir zamanda gelişimin tüm evrelerine ait folikülleri içerir ve olgun bir oosit, ovulasyon öncesi folikülden ayrıldığında sona erer (Şekil 2.2) (van den Hurk ve Zhao, 2005 derlemesinden alınmıştır).



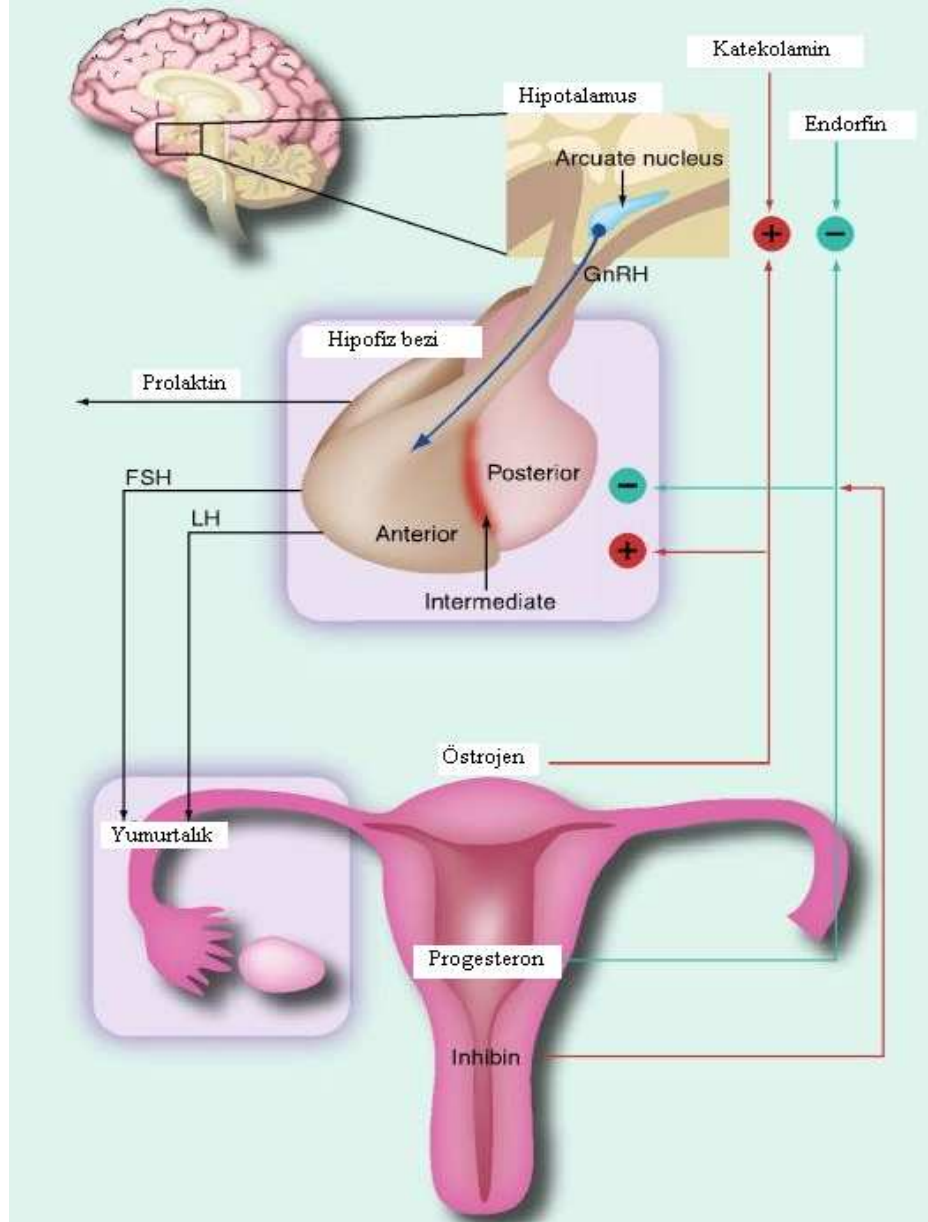
Şekil 2.2: Ovaryum yapısı (Encyclopedia Britannica, 2007)

Farklı gelişim evrelerindeki foliküllerin kesit görüntüsü (Primordiyal foliküller olgunlaşmamış oositleri içerir, oositi bazal laminadan ayıran granül hücreleriyle çevrili bir tabakadan oluşur. Primordiyal foliküllerdeki granül hücreleri yassı bir tabakadan kübik yapıya değişirler, bu değişim primer folikül oluşumunun işaretidir. Oosit genomu aktive olur ve gen transkripsiyonu başlar. Oositin etrafında, oositi çevresindeki granül hücrelerinden ayıran "zona pellusida" denilen glikoprotein polimeri olan bir kapsül oluşur. Zona pellusida ovulasyon sonrasında oositle birlikte kalır, sperm girişini katalizleyecek enzimleri içerir. Granül hücrelerinin etrafında ikinci bir tabakanın oluşumuyla primer foliküller, sekonder foliküllere dönüşür. Bu noktada folikülün mitotik aktivitesi yüksektir, önceki gibi uzun sürmez ve çok tabakalı granül hücreleri oluşur. Graaf folikülü ya da antral folikül olarak da isimlendirilen tersiyer folikül, antrum denilen oosit yanında sıvı kaplı girintinin (kavite, oyuk) oluşumuyla ortaya çıkar. Olgun folikülün temel yapısı oluşur. Dominant folikül olarak adlandırılan sadece bir folikül yaşamaya devam ederek hızlı büyümeye girer ve 20 mm çapına ulaşarak preovulatör folikülü oluşturur. Onüçüncü menstrual siklusun foliküller fazı sona ermesiyle, preovulatör folikül stigmayı geliştirir ve ovulasyon denilen süreçle kumulus hücrelerin tüm içeriğini oositle birlikte boşaltır. Oosit fertilizasyona gidebilecek özelliktedir ve fallop tüpleriyle uterusu taşınır. Tam olarak gelişmiş oosit (gamet) menstrual siklusla katılabilir. Parçalanmış folikül, korpus luteum şeklinde değişime uğrar ve folikülogenez süreci tamamlanır).

2.2.2. Hormonal Fonksiyon

Folikülogenez endokrin sistem tarafından kontrol edilir. Folikülogenez düzenlenmesinde pozitif ve negatif feedback sürecine beş hormon katılır: hipotalamustan salgılanan gonadotropin-serbest bırakan hormon (GnRH, gonadotropin-releasing hormone), FSH ve LH

olmak üzere iki gonadotropin ile östrojen ve progesterondur (Chappel, 1991; Zafeiriou, 2000; Caglar, 2005). (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Folikülojeniz düzenlenmesinde rol alan pozitif ve negatif feedback yolu (Women's Health-Future Medicine Ltd, 2009)

Bu süreçte yer alan hormonlar: GnRH, FSH, LH, Östrojen, Progesteron.

GnRH, hipofiz bezinin ön kısmından FSH ve LH salınımını uyararak daha sonraki aşamada folikül büyümesi üzerine uyarıcı etki yapar (bu etkiyi hemen gerçekleştirmemesinin nedeni, sadece antral foliküllerin FSH ve LH'a bağımlı olmasıdır). Teka hücreleri, tersiyer folikülü oluşturduğunda östrojen miktarında keskin bir artış gözlenir (teka türevli androjen, granüloza hücreleri tarafından aromatize edilerek östrojene dönüştürülür) (Liu ve Hsueh, 1986).

Yüksek miktardaki östrojen, gonadotropinler üzerinde zıt bir uyarma etkisine sahiptir. LH ve FSH yükselmeye başlar. Daha fazla östrojen salgılanmasına bağlı olarak teka hücreleri tarafından daha fazla miktarda LH reseptörleri yapılır. Bu durum teka hücrelerinin östrojeni azaltmak amacıyla fazla miktarda androjen oluşturmak için teşvik edilmesine yol açar. Bu pozitif feedback LH seviyesinde ani yükselişe neden olur ve bu yükselme ovulasyonu sağlar (Fraser ve Bouchard, 1994 derlemesinden alınmıştır).

Ovulasyonu takiben LH, korpus luteum oluşumunu uyarır. Ovulasyon sonrasında östrojen negatif uyarıcı düzeyine düşer, FSH ve LH konsantrasyon düzeyinin korunmasında görev yapar. Korpus luteumdan salgılanan inhibin de FSH inhibisyonuna katkıda bulunur (Tsonis ve diğ., 1986).

Endokrin sistem menstrual siklusla aynı döneme denk gelir ve normal folikülogenez süresince 13 sıklusa gider (onüç LH artışı). Bununla birlikte, koordineli enzim sinyali ve hormonal reseptörlerin zamana bağlı anlatımı folikül büyümesinin erken dönemdeki ani yükselişlerden etkilenmemesini sağlar (Filicori ve diğ., 1984).

2.3. POY NEDENLERİ (ETİYOLOJİSİ)

POY'un ortaya çıkmasında rolü olduğu düşünölen pek çok olası gen tanımlanmış olmasına rağmen, POY'un nedeni büyük ölçüde anlaşılamamıştır (idiyopatik). Bu idiyopatik form da sporadik ve ailesel POY formunu gösterebilir. POY'a yol açan farklı nedenler şu şekilde sıralanabilir: kromozomal ve genetik anomaliler, otoimmün hastalıklar, viral infeksiyonlar ve iyatrojenik tedavi (örneğin pelvik cerrahi, kemoterapi, radyoterapi gibi). Ancak, olguların önemli bir kısmında, herhangi bir etiyolojik faktör tanımlanamamaktadır (Rebar ve Cedars, 1992). Başlangıçtaki folikül havuzunun küçük olması ve/veya graaf foliküllerinin uygun olmayan lüteinizasyonu, spontan POY'un nedenleri olarak ileri sürölmüştür (Duncan ve diğ., 1993; Nelson ve diğ., 1994).

2.3.1. İyatrojenik POY (cerrahi, kemoterapi, radyoterapi)

POY'a neden olan en önemli ilaç grubu kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlardır. Özellikle lösemi ve lenfoma tedavisinde kullanılan alkilleyici ajanlar olarak adlandırılan kemoterapötik ilaçlar POY'un en sık nedenidirler. Kemoterapi sonrasında yapılan over biyopsilerinde, primordiyal foliküllerde belirgin azalma görülür (Familiari ve diğ., 1993; Larsen ve diğ., 2003). Kemoterapi sonrası bazen yumurtalık fonksiyonları geri dönebilir. Kemoterapi sonrası oluşan gebeliklerde gebelik kaybı veya anomali riski normale göre daha yüksektir.

Genel olarak, daha genç olan kadınlar, kemoterapötiklerin etkilerine karşı daha fazla dirençlidirler (Koyama ve diğ., 1977), ergenlik öncesi dönem ise overlerde gonadotoksisitenin en az göröldüğü dönemdir (Beerendonk ve Braat, 2005). Siklofosamid, metotreksat ve fluorourasil kombinasyonundan oluşan bir tedavi rejimini takiben amenore görölme olasılığı, 40 yaşın üzerindeki kadınlar için % 76, 40 yaşın altındakiler için ise % 40 olarak verilmiştir (Bines ve diğ., 1996).

Benzer şekilde, radyoterapinin de önemli etkileri olduğu bildirilmektedir. Eğer her iki overe de radyoterapi uygulanmış ise gonadotoksisite daha belirgindir (Schuck ve diğ., 2005). Radyasyonun overlere etkisi, yaşa ve doza bağlı olarak değişmektedir. 600 cGy ve üstü dozların 40 yaş ve üzerindeki kadınlarda kişisel farklılıklar göstermekle birlikte POY'a neden

olabileceği bildirilmiştir (Morris ve Shalet, 1990; Thibaud ve diğ., 1992) . Tedavinin hemen ardından hastaların % 97.5'inde ortaya çıkan POY'daki fraksiyone radyoterapi efektif kısırlaştırıcı dozu, yaşla birlikte azalır (Wallace ve diğ., 2005).

Pelvik radyoterapi öncesinde cerrahi olarak overlerin radyoterapi sahası dışına taşınmasının başarılı olduğuda bildirilmektedir (Thibaud ve diğ., 1992). Operasyonla rahimi alınan hastalarda da yumurtalık kan akımının bozulmasına bağlı olarak POY oluştuğuna dair veriler bulunmaktadır (Mercan, 2009 derlemesinden alınmıştır).

Çocukluk çağı kanserlerinin tedavisinde yüksek doz kemo- ya da radyoterapi uygulaması, ergenliğin gecikmesi, tam olmaması ya da hiç olmaması gibi ciddi sonuçlar doğurabilir (Muller, 2002).

Günümüzde kemoterapi ve radyoterapinin neden olduğu POY'u engellemek ve fertilizasyonu korumak amacıyla over dokusu kriyoprezervasyon ve otolog transplantasyonu denenmektedir. Oktay ve diğ. (2001) yaptıkları çalışmada, iki vakaya kanser cerrahisi ve pelvik radyoterapi öncesinde overin kriyoprezervasyonunu takiben 6-10 ay içerisinde ön kol cilt altı dokusuna otolog ovaryum transplantasyon uygulanmış ve premenopozal serum östradiol, FSH ve LH seviyeleri elde ettiğini bildirmiştir.

2.3.2. Otoimmün POY

Otoimmünite vücudun kendi hücrelerini yabancı görerek yok etmesi olarak tanımlanabilir. Otoimmün ooforit, önemli bir POY nedenidir, olguların % 10-30'unda görülür (Nelson ve diğ., 1996).

Otoimmün lenfositik ooforite, sıklıkla, periferik T hücre aktivasyonu da eşlik etmektedir (Nelson ve diğ., 1991). Lenfosit infiltrasyonunun, olgun foliküllerde daha belirgin olması, otoantijen sentezinin gonadotropin bağımlı olduğunu düşündürür (Irvine ve diğ., 1968). Bu nedenle otoimmün nedenli POY olan kadınların yıllık olarak bu hastalıklar yönünden de taranması gerekir.

POY, otoimmün poliglandüler sendrom (autoimmune polyglandular syndrome-APS)'un bir bileşeni olarak, Addison hastalığı, insülin bağımlı diabetes mellitus (IDDM) ve hipotiroidi ile birlikte karşımıza çıkabilir. APS tip I, otozomal resesif geçişli olup, kromozom 21q22.3'de lokalize tek bir genin defekti nedeniyle oluşur ve insan lökosit antijeni (HLA) ile ilişkisi yoktur (Nagamine ve diğ., 1997).

APS tip I, otoimmün poliendokrin-kandidiazis-ektodermal distrofi (autoimmune polyendocrine-candidiasis-ectodermal dystrophy APECED) olarak da bilinir ve olguların % 60'ında POY ile birlikte (Wheatcroft ve Weetman, 1997). APS tip II, (Schmidt sendromu) ise Addison hastalığı, insülin bağımlı diabetes mellitus (IDDM), hipotiroidi ve POY'ü kapsayan bir bozukluktur.

2.3.3. Galaktozemi

Galaktozemi, galaktoz-1-fosfat üridil transferaz enziminin eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkar. Nadir görülen otozomal resesif geçişli bir bozukluk olup, kromozom üzerindeki yeri 9p13 olarak belirlenmiş olan *GALT* genindeki mutasyona bağlıdır (Laml ve diğ., 2002; Forges ve Monnier-Barbarino, 2003). Bu hastalarda galaktoz ve metabolitlerinin vücutta birikmesi sonucunda hepatoselüler, oküler, renal ve nörolojik hasarlar gözlenmektedir. Galaktozemiye yönelik yapılan çalışmalarda, galaktozemide biriken galaktoz ve metabolitlerinin oositler üzerine de toksik etki yaparak prematür destrüksiyona (tahribata) yol açtıkları bilinmektedir (Chen ve diğ., 1981).

Bazı hayvan modellerinde, gebe farelere yüksek galaktoz içeren diyet verilmiş ve premayotik dönemde fetal oosit sayısında azalma olduğu bildirilmiştir (Chen ve diğ., 1981). Takip eden çalışmalarda POY'lu olgularda yapılan over biyopsilerinde primordiyal foliküllerin bulunduğu ancak foliküler büyüme ve gelişmede anormallikler olduğu bildirilmiştir (Levy ve diğ., 1984).

Galaktozeminin kabul edilen bir diğer etkisi de gonadotropinlerin glikolizasyonunun etkilenerek biyolojik aktivasyonlarının azalmasıdır. Özellikle FSH ve izoformlarının bu hastalarda nötral bir izoelektrik değere sahip oldukları ve FSH reseptörlerine afiniteleri yeterli

düzeyde olsa da adenilat siklaz aktivasyonlarının yetersiz kaldığı bildirilmektedir (Prestoz ve diğ., 1997).

Yapılan çalışmalarda galaktozemili 47 kadının % 81'inde POY geliştiği tespit edilmiş ve bunların yaklaşık % 83'ünün sekonder amenore şikayeti ile tanı aldığı bildirilmiştir (Waggoner ve diğ., 1990).

2.3.4. Enzim Eksiklikleri

Enzim eksiklikleri östrojen sentez bozuklukları ve ergenlikte gelişim bozukluklarına neden olarak, primer amenore ve ovaryum yetmezliğine sebep olabilmektedir (Yanase ve diğ., 1990).

Androjenlerin östrojene dönüşümünü katalizleyen aromataz enzim eksikliğinin, 24 ve 28 yaşlarındaki erkek ve kız kardeşte cinsiyet karakterleriyle ilişkili klinik ve histolojik bozukluklara neden olabileceği bildirilmiştir (Morishima ve diğ., 1995). Kolesterol desmolaz enziminin eksikliği, steroid hormon sentezinin bozulmasına yol açar. Bu durumda, hastalar nadiren erişkinliğe kadar hayatta kalabilirler (Zachmann, 1995). 17 α -hidroksilaz enziminin eksikliği ise hem adrenal hem de gonadal steroid hormon sentezini bozmaktadır. 17 α -hidroksilaz eksikliğinde hastalarda hipertansiyon, hipokalemi ve ovaryan yetmezlik ile ovaryan-adrenal steroid sentezinde bozukluklar gözlenmiştir (Kater ve Biglieri, 1994). 17 α -hidroksilaz enzimi kusurlu kadınların primer amenore ile karakterize olduğu belirtilmiştir (Rabinovici ve diğ., 1989). İzole 17-20 desmolaz eksikliği olan hastalarda ise, adrenal fonksiyon normal olmasına karşın, over yetmezliği söz konusudur. 17-20 desmolaz eksikliğinin tek başına POY'a yol açabileceği bildirilmektedir (Bachelot ve diğ., 2005).

2.3.5. Gonadotropin ve Gonadotropin Reseptör Bozuklukları

Sekonder cinsiyet karakteristikleri iyi gelişmemiş, primer amenore ve infertilesi olan bir hastada, FSH'nin β alt biriminde mutasyon gösterilmiştir (Toledo ve diğ., 1996). FSH'nin reseptörlerine bağlanmasında bozukluk oluşturan bu durum, folikül gelişiminin yetersiz olmasına yol açar. Bu durumda dışarıdan verilen FSH ile yumurta üretimi ve gebelik geliştiği bildirilmiştir (Matthews ve diğ., 1993).

FSH reseptör genindeki mutasyonun da hipogonadotropik primer amenore nedeni olabileceği bildirilmiştir (Aittomaki ve diğ., 1995; Sundblad ve diğ., 2004). Bu gen açısından heterozigot olan kadınların fertil olup, değişen düzeylerde sekonder cinsiyet karakteristiklerine sahip oldukları ve over biyopsilerinde primordiyal folikül varlığı gösterdikleri bildirilmiştir (Aittomaki ve diğ., 1996). Bu durum, otozomal resesif geçiş gösterir (Simpson ve diğ., 1971).

LH reseptörünü sentezleyen genlerdeki mutasyonlar da POY'a yol açabilir (Latronico ve diğ., 1996). Bu durumda amenore, normal sekonder cinsiyet karakteristikleri ve normal ya da orta düzeyde artmış FSH düzeyleri gözlenir. Over biyopsilerinde ise yalnızca primordiyal, preantral ve antral foliküller vardır ancak; preovulatör foliküller, korpus luteumlar ya da korpus albicanslar ile ilişkili herhangi bir bulgu yoktur (Toledo ve diğ., 1996).

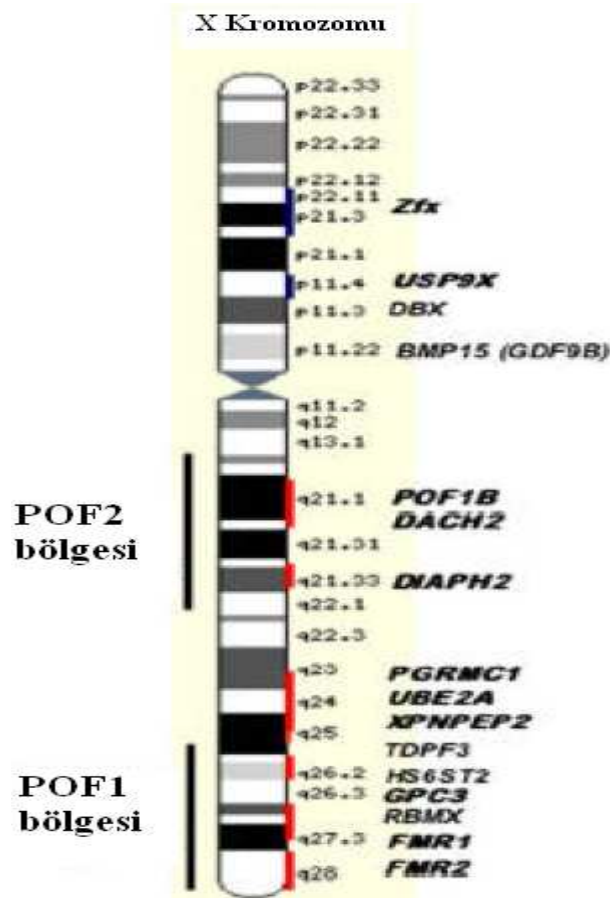
2.3.6. Kromozomal ve Genetik Bozukluklar

Amenore ile başvuran genç kadınların % 25'inde POY görülür. POY olan kadınların % 5-30'unda ailedeki diğer bir dişi bireyinde etkilendiği görülür. Bu olgularda kalıtım tipi, X'e bağlı dominant-resesif ya da otozomal dominant-resesif olabilir. 45,XO karyotipine sahip fetuslarda (Turner sendromu), overlerin uterusda gelişimi normaldir. Ancak, doğumdan sonra, ikinci X kromozomunun yokluğu nedeni ile, POY'a yol açan hızlanmış bir foliküler atrezi görülür (Singh ve Carr, 1966; Migeon ve Jelalian, 1977). X kromozomunun tam yokluğundan daha sık olarak karşımıza çıkan durumlar ise, mozaizm olarak adlandırılan 45, XO / 46, XX ; 46, XX / 47, XXX genetik yapılarıdır (Sarto, 1974).

İnsan X kromozomu üzerindeki X inaktivasyon merkezi, Xq13 bölgesinde lokalizedir (Brown ve diğ., 1991). Bu bölgeye yakın bir delesyon ya da yeniden düzenlenme X inaktivasyon merkezini etkileyebilir ve bireyde hafif bir Turner benzeri görünüm oluşturabilir (Powell ve diğ., 1994). İnsan X kromozomu üzerindeki diğer kritik bölgeler Xq13-q22 ve Xq22-q26 bölgeleridir (Therman ve diğ., 1990). Xq21.3-q27 bölgesinde bulunan POF tip I geni, overin işlevi açısından önemlidir (Ahonen ve diğ., 1988). Bunların dışında, POY ile ilişkili olduğu düşünülen diğer genlere dair kanıtlar da literatürde yer almaktadır (Bondy ve diğ., 1998; Murray, 2000; Luoma ve diğ., 2004; Kok ve diğ., 2005).

2.4. POY GENETİĞİ

POY sendromu, insanda folikül oluşumunu (folikulogenez) kontrol eden kompleks genetik ağ nedeniyle heterojenik bir klinik hastalıktır. Deneysel çalışmalardan elde edilen bilgilere göre bu genlerin dişi eşey kromozomunda *POF1* (Xq26-q28) ve *POF2* (Xq13.3-q22) bölgelerinde kümelenmiş olabileceği tahmin edilmektedir (Fassnacht ve diğ., 2006) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: İnsan X kromozomuna ait G-Bantlı yapısal görünüm (Fassnacht ve diğ., 2006)

Kromozomun sol tarafında POF1 ve POF2 bölgelerinin kromozomal lokasyonları gösterilmektedir. Sağ tarafta ise literatüre göre haritalanmış aday POY genleri yer almaktadır.

2.4.1. Dişi Fertilitisini Etkileyen Yapısal X Kromozomu Değişiklikleri

X kromozomunun kısa kolundaki delesyonlar primer amenore ile sonuçlanırken; uzun kolundaki delesyonlar ise primer ya da sekonder ovaryum yetmezliği ile sonuçlanmaktadır (Sybert ve McCauley, 2004). Sekonder ovaryum yetmezliği, normal ergenlik sonrasında foliküler disfonksiyon ve folikülün erkenden tüketimi ile karakterizedir (Anasti, 1998).

POY hastalarında X-kromozomu ile otozomal translokasyonların kırılma noktalarının haritalanmasıyla Xq'da *POF1* (Xq26-q28) ve *POF2* (Xq13.3- q22) olmak üzere iki önemli bölge belirlenmiştir. *POF1* lokusundaki distal (telomere yakın) delesyonlarda 24-39 yaşlarda POY gelişirken (Krauss ve diğ., 1987, Tharapel ve diğ., 1993), *POF2* lokusundaki translokasyonlarda 16-21 gibi daha erken yaşlarda POY gelişmektedir (Powell ve diğ., 1994).

Xq delesyonları incelendiğinde POY'a neden olan mekanizmalardan birinin "gen dozaj etkisi"; yani X inaktivasyonundan kaçan genlerin anlatımının yapılmaması (haploid düzeydeki yetmezliği) olabileceği belirtilmiştir (Sala ve diğ., 1997). POY'a neden olan bir diğer mekanizmanın ise; normalde X inaktivasyonundan kaçmamış genlerin X kromozomu üzerinde kırılma noktasında yer almaları nedeniyle translokasyon sonucu hasara uğraması şeklinde açıklanmaktadır. Bununla birlikte, her iki tip Xq düzenlenmesinde de (delesyon / translokasyon), genlerin haploid düzeydeki yetmezliği ("haploinsufficiency") her iki X kromozomunun da aktif olduğu oogenezin çok erken aşamalarında aktif konumdadır (Powell ve diğ., 1994).

POY'a neden olan Xq delesyonları q13-q28 arasındaki bölgeyi kapsamaktadır. Bulgular da bu kromozomal bölgenin normal ovaryum fonksiyonu için kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir. Bu hipotez, Xq21-27 ve Xq26-qter bölgerinde kalıtsal farklı delesyonları taşıyan POY'lu kadınlar üzerinde yapılan ailesel çalışmaların sonuçlarıyla desteklenmiştir (Krauss ve diğ., 1987; Veneman ve diğ., 1991; Tharapel ve diğ., 1993). Davison ve diğ. (1998) tarafından yapılan çalışmada POY hastası olan proband (ailede ilk teşhis konulan) kadın ve annesinin Xq26.2 delesyonu taşıdığı tanımlanmıştır.

POY fenotipinin ortaya çıkmasına yönelik, ovaryum gelişimi ve/veya oogenezde rol alan pek çok genin dengeli translokasyon sonucu çalışmaz hale gelmesi şeklinde açıklamalar mevcuttur (Sala ve diğ., 1997). Ovaryum disgenezi (gelişim anormalliği), büyük çoğunlukla XO genotipine sahip kadınlar ile Xq kolunda büyük delesyon bulunan kadın bireylerde tanımlanmıştır. Xq-otozom translokasyonu ile ilişkili POY'da da benzer durum bildirilmiştir (Schmidt ve Du Sart, 1992). Kromozomdaki yapısal değişim, normalde her iki X kromozomunda aktif olan genin (ya da genlerin) fonksiyonel açıdan hemizigot olmasına yol açarak yüksek dozaj gereksinimini ortaya çıkarmaktadır (Sala ve diğ., 1997).

Marozzi ve diğ.'nin (2000) yer aldığı çalışmada Xq delesyonu, potansiyel POY nedenleri arasında en önemlisini oluşturmaktadır. Analizi yapılan tüm vakalarda yeniden düzenlenen X kromozomunun inaktivasyona uğradığı saptanmıştır. POY'a neden olan bu durumun moleküler mekanizması temel olarak, delesyona uğrayan bölge içerisinde yer alan genlerin "haploid düzeydeki yetmezliği ve X inaktivasyonundan kaçışı" olarak açıklanmaktadır. POY oluşumunu etkileyen diğer bir faktör olarak da, normalde X inaktivasyonundan kaçan Xp üzerinde yer alan genlerin "dozaj etkisi" ve translokasyona uğramış otozomal segmentlerin belirli dokularda "tamamlanmamış inaktivasyonu" sayılmaktadır (incomplete inactivation) (Marozzi ve diğ., 2000a).

2.4.1.1. *POF1 Bölgesi (Xq26.2 – q28, OMIM: 311360)*

POY sendromlu hastalarda 20 yılı aşkın süreyle X kromozomunun uzun kolunda belirlenen küçük delesyonlar, X kromozomunda uzun kolun uç kısmında bulunan insan folikülogenezinden sorumlu bir bölgenin varlığını ortaya çıkarmıştır (Xq26-qter), (Fitch ve diğ., 1982). 6 POY hastasında problarla yapılan moleküler delesyon analizinde POF1 bölgesi Xq26.2-q28 aralığında belirlenmiştir (Marozzi ve diğ., 2000a). *POF1* dizisinin 22 Mb boyunda ve dizi analizine göre 190 gen içerdiği bilinmektedir.

FMR1 geni (Frajil X Mental Retardasyon 1), Xq27.3'de yer alan en önemli POF1 aday genidir (Sullivan ve diğ., 2005). 38 kb boyunda ve 17 ekzondan oluşmuş 4.4 kb'lık transkripti kodlar. Terminal ekzonların alternatif kırılmasıyla FMR1 protein (FMRP) izoformları oluşturulur (O'Donnell ve Warren, 2002).

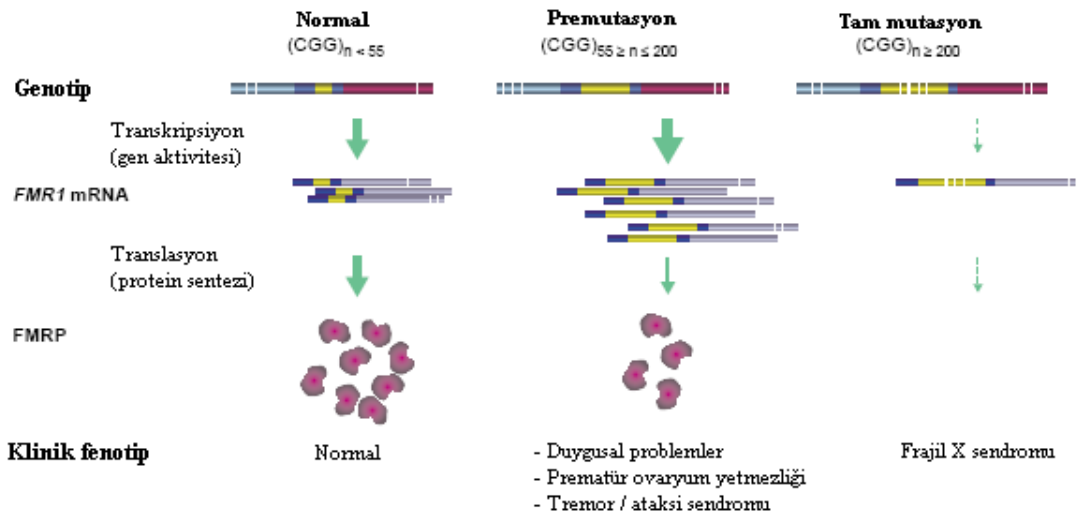
Martin-Bell sendromu ya da marker X sendromu olarak da adlandırılan frajil X (kırılgan X) sendromunun altında yatan neden, Xq27.3 gen bölgesinde bulunan ailevi mental retardasyon (*FMR1*) geninde oluşan bir değişmedir (Sala ve diğ., 1997). Hastalardaki klinik bulgular arasında otizm, dikkat eksikliği sendromu (ADD /ADHD), hiperaktivite bozukluğu, bağ doku bozuklukları ve konvülziyonlar sayılabilir. Mozaizm durumunda da benzeri değişiklikler görülmekle birlikte bunlardaki bulgular daha hafiftir ve daha zor tanınırlar (NICHD, 2004).

Frajil X sendromu, *FMR1* geninin ekzon 1' deki 5' anlatım yapmayan bölgede (5' UTR), CGG üçlü nükleotid tekrarındaki artışla meydana gelir (Verkerk ve diğ., 1991; Brown, 2002). Normal bireyler genellikle 5-54 arasında üç nükleotid tekrarına sahipken, tam etkilenmiş bireyler >200 CGG tekrarına sahiptirler. Frajil X premutasyon allelleri, 55-200 arasındaki CGG tekrarıyla tanımlanır ve gelecek nesillerde tekrar sayısının artışıyla tam mutasyona dönüşme riski taşır. Bir nesilde tam mutasyona dönüştüğü bilinen en küçük CGG tekrar sayısı 59 olarak bildirilmiştir (Nolin ve diğ., 1996; Sherman, 2002).

POY'lu 147 hasta tarandığında tam mutasyonlu hastaya rastlanmamışken, 6 kadının premutasyonlu olduğu saptanmıştır (Sherman, 2000). Premutasyon taşıyıcısı kadınların yaklaşık %20'sinde POY meydana geldiği gösterilmiştir (Schwartz ve diğ., 1994; Allingham-Hawkins ve diğ., 1999). POY genel populasyonun ~%1'inde görülürken, POY'lu kadınlarda yapılan *FMR1* taraması sonucunda ~%6'sının premutasyon için pozitif olduğunu ortaya koymuştur (Giovannucci Uzielli ve diğ., 1999; Marozzi ve diğ., 2000b). Premutasyonlu kadınlarda yapılan çalışmalarda, POY gelişmeden önceki dönemde FSH düzeylerinde artış saptanmıştır (Baat ve diğ., 1999; Murray ve diğ., 2000b). Premutasyonlu kadınların POY için yüksek risk taşıdıklarından aile planlaması için kapsamlı ve zamanında genetik danışma almalarında fayda vardır. Tüp bebek seçeneğini deneyecek aileler için yumurta rezervi azalmış kadınlarda preimplantasyon genetik tanı (PGT) güç ve kimi zamanda imkansız olabilmektedir (Hagerman, 2002). Hundscheid ve diğ. (2000) de çalışmalarından elde edilen

ilk verilere göre POY'lu premutasyon taşıyıcısı kadınlarda premutasyonun babadan kalıtıldığı, Vianna-Morgante ve Costa (2000) ve Sherman (2002) derlemesinde yer alan verilere göre de anne ve babadan kalıtımın POY ile ilişkili olduğuna yer verilmiştir.

FMRI gen anlatımı çalışmaları, premutasyon aralığındaki CGG artışlarının premutasyon taşıyıcılarında gen anlatımının bozulduğuna kanıt oluşturmaktadır (Şekil 2.5). Frajil X Sendromunun klinik açıdan şiddeti, periferik kan lenfositlerindeki FMR1 protein (FMRP) değerlerindeki düşüşle ilişkili bulunmuştur (Tassone ve diğ., 1999). Tam mutasyon aralığında (>200 CGG tekrarı), azalan protein düzeyinin (ya da protein yokluğu) *FMRI* genindeki hipermetilasyon ve sessizleşmesi sonucunda gerçekleştiğine inanılmaktadır (Oberle ve diğ., 1991; Pieretti ve diğ., 1991). Premutasyon aralığında ilginç olarak azalan FMRP düzeyine rağmen, *FMRI* gen transkripsiyonunda azalma görülmez (Şekil 2.5.). Tam tersine premutasyon aralığında mRNA düzeylerinde artış gözlenmektedir, özellikle erkeklerde premutasyon oranı normalden üst düzeye çıktıkça (>100 CGG tekrarlarında) 5-10 kat artış göstermektedir (Tassone ve diğ., 2000b). Artan mRNA düzeyine karşın FMRP azalışı, translasyon etkinliğindeki azalmanın öncelikle protein düzeyindeki azalmadan sorumlu olduğunu, bu durumun artan mRNA düzeyinin transkripsiyonda dengeleyici uyarıcı rol oynadığını göstermektedir (Tassone ve diğ., 2000b).



Şekil 2.5: Normal, premutasyonlu ve tam mutasyonlu bireylerde FMR1 gen anlatım modelleri (Hagerman, 2002).

CGG tekrarları sarı renkte gösterilmiştir. Premutasyon aralığında; artan mRNA düzeyine rağmen, FMRP düzeyinde azalış görülmektedir.

Translasyondaki (gen anlatımı) kusurun çıkış noktası tam olarak bilinmemekle birlikte, FMR1 mRNA'sı 5'UTR bölgesinde yer alan artmış CGG tekrarlarından kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir (Ashley ve diğ., 1993). Artış gösteren CGG tekrarlarının kararlı bir yapı oluşturarak translasyonun başlamasını bloke edebileceği yönünde görüşler vardır. Nitekim tetrahelikal CGG tekrarları, DNA oligomerlerinde gözlenmiştir (Weisman-Shomer ve diğ., 2000). Bununla birlikte in vivo 5'UTR bölgelerinde benzer yapıların oluştuğuna ya da artış gösteren CGG tekrarlarının ribozomal birimlerin (subunit) hareketini bloke ettiğine yönelik direkt kanıt bulunmamaktadır.

Her 250 kadından ve her 800 erkekten birinin Frajil X premutasyonunun taşıyıcısı olduğu, tam mutasyon görülme sıklığının ise kadınlarda 1/4000-6000, erkeklerde 1/3600 olduğu düşünülmektedir (Fast ve Abrams, 2006). Bu durumda, nedeni bilinmeyen POY olgularının, *FMR1* geni için taşıyıcı olma olasılığı 1/50 olarak hesaplanmaktadır. POY olan ve ailesinde POY öyküsü olan kadınlarda bu olasılık 1/15'e kadar çıkmaktadır (Bussani ve diğ., 2004).

Frajil X premutasyonu, sporadik olarak da ortaya çıkabilir (Bussani ve diğ., 2004). Frajil X premutasyon genini taşıyan kadınların % 20-28'inde POY görülür ve bu olguların yardımcı üreme tedavilerine verdikleri yanıt iyi değildir. Bu kadınlar, ayrıca, tam mutasyonlu çocuklara sahip olma riskini taşırlar. Frajil X tam mutasyonu olan kadınlarda POY sık olmamakla birlikte, erken menopoza girme eğilimi söz konusudur (Fast ve Abrams, 2006).

46,X,delX(q26) karyotipine sahip POY ailesinde yapılan moleküler kırılma noktası analizine göre üç aday POY geni daha aydınlatılmıştır: *Heparan Sülfat 6-O-Sülfotransferaz 2 (HS6ST2)*, *Transkripsiyon Faktör DP Ailesi, üye 3 (TDPF3)*, *Glipikan 3 (GPC3)* (Davison ve diğ., 2000).

HS6ST, heparan sülfatın N-sülfoglukozamin alt birimi 6. pozisyonuna 3'-fosfoadenozin 5'-fosfosülfatdan sülfat transferini katalizler. Heparan sülfat proteoglikanları (HSPG) hücre yüzeyinde ve ekstraselüler matriksde her zaman mevcuttur. Heparin bağlı büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks bileşenleri, proteaz inhibitörleri ve lipoprotein lipaz gibi farklı proteinlerle etkileşim halindedirler. HSPG hücre gelişimi, çoğalma, farklılaşma, adezyon, migrasyon gibi morfolojik düzenlemede ve viral enfeksiyon, kan pıhtılaşması gibi fizyolojik durumlarda da rol alır (Davison ve diğ., 2000).

Heparan sülfat, fibroblast büyüme faktörlerinin reseptörlerine ve diğer büyüme faktörlerine yüksek afiniteye bağlanabilmesi için gereklidir. Farklı sülfotransferazların, morfolojik düzenlenmeyi ve hücre büyüme faktörlerini etkileyerek heparan sülfatın uygun yapısını bozduğu (etkilediği) varsayılmaktadır. Yumurtalıkta fazlasıyla gerekli olan foliküler büyüme faktörlerinin, *HS6ST* geninin bloke edilmesiyle inhibe olduğu ve heparan sülfat ligandına bağlanmasını etkilediği düşünülmektedir (Davison ve diğ., 2000).

Proteoglikanların sülfürlenmesinin (sulfation) önemli rolü *Drosophila* oositinde gösterilmiştir (Sen ve diğ., 1998). HS6ST'ye benzer bir enzimin folikül hücrelerinde anlatımı yapılır, oositin oluşum mekanizması ve embriyonik polaritede önemli rol oynar. İnsan oositinde de benzer rol, HS6ST tarafından gerçekleştirilir. *HS6ST* geni, *Drosophila* geni *egl* ile karşılaştırıldığında bu genin oosit mikrotübül polaritesinde gerekli olduğu ortaya çıkmıştır. İmmünopresipitasyon çalışmaları, *egl* proteinin oosit farklılaşmasından embriyo aksisinin belirlenmesine kadar oogenezin tüm aşamalarında oositte lokalize olduğunu göstermektedir (Mach ve Lehmann, 1997).

***HS6ST* geni** POF1 lokusunda kırılma noktasına yakın yerde tanımlanmış önemli aday POY genlerinden biridir. *HS6ST* geni, dört ekzondan oluşmaktadır ve delesyonlara ilaveten translokasyonlarla da aktivitesi engellenebilir. Bunun dışında, fertilitede önemli rolü olan ve *Drosophila* oositlerinde sülfotransferaz aktivitesi kanıtlanan *Drosophila egl* geniyle güçlü benzerlik göstermektedir (Davison ve diğ., 2000).

Glipikan 3 (*GPC3*), glipikan ailesinin bir üyesidir, 500 kb boyutunda 8 ekzondan oluşan bir gendir ve insanda Xq26 da yer aldığı FISH (*Floresan In Situ Hibridizasyon*) yöntemiyle haritalanmıştır (Pilia ve diğ., 1996; Shen ve diğ., 1997). *GPC3* anlatımı embriyoda yüksek

miktarda yapılırken yetişkinlerin kolon ve yumurtalığında sınırlandırılmıştır. *GPC3*'ün MCF-7 meme kanseri hücrelerinde *in vitro* koşullarda apoptozu teşvik ettiği ve yumurtalıkta tümör supresör olarak rol aldığı gösterilmiştir (Lin ve diğ., 1999). Bununla birlikte *GPC3*'ün normal yumurtalıkta apoptoz düzenlenmesinde yer aldığına yönelik kanıt bulunmamaktadır.

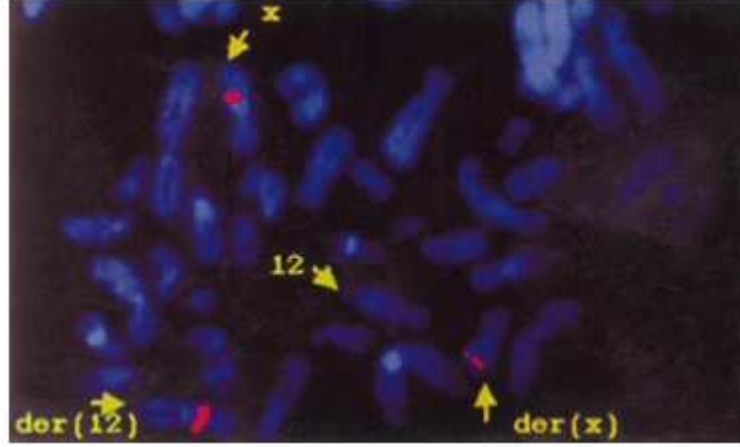
GPC3 genindeki mutasyonlar “Simpson dysmorphia sendromundan (SDYS)” sorumludur ve X'e bağlı resesif olarak kalıtılır (Simpson ve diğ., 1975). Bu sendromun fenotipik etkileri; normal zekayla birlikte genel olarak kısa boylu tıknaz görünüm, geniş çıkıntılı çene yapısı, geniş burun köprüsü, büyük dil, küçük el ve parmaklar ya da ileri seviyede yarı damak, kardiyak anomaliler, mental retardasyon görülür. Ovaryum üzerindeki etkileri bakımından, hastalıktan etkilenmiş dişi bireyler üzerinde yapılan çalışmada herhangi bir yan etkiden bahsedilmemiştir (Pilia ve diğ., 1996). *GPC3* mutasyonu bakımından heterozigot olan bir annenin ovaryumunda kusurlu gelişim bozukluğu saptanmamıştır, fakat bu vakada daha sonradan erken menopoz gerçekleşip gerçekleşmediği bilinmemektedir (Golabi ve Rosen, 1984). *GPC3* POF1 lokusu içinde yer alan multi-ekzonlu bir gen olmasına rağmen, POY olgulu vakalarda *GPC3* mutasyonuna bağlı fenotipik karakterler görülmemektedir.

2.4.1.2. POF2 Bölgesi (Xq13.3-q22, OMIM: 300511)

İlk olarak paternal kaynaklı dengeli translokasyonla 46,X,t(X;6)(q13.3-21;p12) tanımlanmıştır (Powell ve diğ., 1994). Moleküler çalışmalarla POY hastalarında X- otozom translokasyonlarının kırılma noktalarının haritalanmasıyla *Diaphanous Homolog 2 (DIAPH2)* (Bione ve diğ., 1998), *Dachshund Homolog 2 (DACH2)* ve *Premature Ovarian Failure, 1B (POF1B)* (Bione ve diğ., 2004) “POF2 aday genleri” ortaya çıkarılmıştır.

***DIAPH2* geni**, Xq22 de yer alır ve 1 Mb boyutundadır. Alternatif kırılmalar ile iki protein izoformu oluşur. *Drosophila*'daki homolog *Diaphanous* genindeki delesyon, spermatogenez ve oogenezi etkiler ve meyve sineğinde infertiliteye yol açar. Bu yüzden, insan *DIAPH2* genindeki hasarın POY sendromuyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Dengeli X-otozomal translokasyonlarını taşıyan hastalarda, inaktivasyon öncelikle normal X kromozomunu etkiler. POY fenotipinin, kırılma noktası pozisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. *DIAPH2* geni gibi Xq21-q22 bölgesindeki spesifik genlerdeki bir hasar sonucu gen anlatımı ancak normal X kromozomu tarafından yapılır (Bione ve diğ., 1998).

DIAPH2'nin insanda normal ovaryum gelişimi ve fonksiyonu için önemli genlerden biri olduğu ileri sürülmektedir (Bione ve diğ., 1998). *Drosophila*'daki *diaphanous (dia)* geninin insandaki homoloğu olan *DIAPH2* geninin translokasyonla bloke olduğu vakaya ait rapor, ailesel POY ile ilişkilendirilmiştir (Philippe ve diğ., 1993; Sala ve diğ., 1997). Aynı genomik bölgede dengeli X;12 translokasyonunun olduğu kırılma noktası (46,X,t[X;12][q21;p1.3]), ailesel POY hikayesi olan hasta BC'de FISH tekniğiyle gösterilmiştir (Şekil 2.6) (Sala ve diğ., 1997). Hasta BC'de 17 yaşında sekonder amenore gelişmiştir. Annesinde de aynı kromozomal değişim mevcut olup, 32 yaşında prematür menopoza tanısı almıştır. Tanı konulduğunda anne ve kızında yüksek miktarda gonadotropin ile normal X kromozomunda inaktivasyon saptanmıştır (Philippe ve diğ., 1993).



Şekil 2.6: Hasta BC'ye ait metafaz örneğinde FISH uygulaması (Sala ve diğ., 1997).

Prob olarak PAC dJ263K1 kullanılmıştır. Normal ve derivatif kromozomlar okla gösterilmiştir. Kromozomlar 4,6-diamidino-2-fenilindol ile boyanmıştır.

DIAPH2 geninde kırılma noktasının son intronda meydana geldiği haritalanmıştır. Translokasyon sonrasında, derivatif X kromozomu üzerindeki *DIA* geninin 12. kromozomdan gelen dizilerle birleşmiş olabileceği ve farklı bir protein sentezlenebileceği öngörülmektedir. Yumurtalıklardaki *DIA* ekspresyonunun bu tip posttranskripsiyonel kontrollere bağlı olabileceği ve regülatör motiflerdeki kaybın, oosit ve ovaryum olgunlaşması yolunda değişikliklere yol açabileceği düşünülmektedir (Bione ve diğ., 1998).

Geniş hasta grubu üzerinde yapılan mutasyon analizi çalışmaları, *DIAPH2* geninin ovaryum gelişiminde önemli rolü olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışmalar POY hastaları arasında *DIAPH2* genindeki mutasyon sıklığının belirlenmesine de yardımcı olmaktadır. *Drosophila dia*'sında olduğu gibi insan *DIAPH2* geni de testiste genel olarak testise özgüdür. Kısır erkeklerde yapılan mutasyon analizinde *dia*'nın *Drosophila* da yaptığı kısırlık etkisini insanda *DIAPH2*'nin gerçekleştirdiği görülmüştür (Bione ve diğ., 1998).

***POF1B* ve *DACH2* genleri**, Xq21'den sentromere doğru yerleşim gösteren 700 kb'lık bir bölgede bulunurlar. *POF1B*, 17 ekzondan oluşur ve genomik DNA'da 100 kb boyutundadır. *DACH2*, 11 ekzondan oluşur ve genomik DNA'da 700 kb yer kaplar (*POF1B*: Gene-ID: 79983, Locus: "HUGO Gene Nomenclature Committee" (HGNC): 13711; *DACH2*: Gene-ID: 117154, Locus: HGNC: 16814).

Her iki geninde POY'lu hastalarda X-otozomal translokasyonu düzenlerinin bozulduğu bulunmuştur (Riva ve diğ., 1996; Prueitt ve diğ., 2002). Bu genlerin tahmin edilen işlevleri; *POF1B*'nin erken yumurtalık gelişimi boyunca anlatım yaptığı, *DACH2*'nin de folikül farklılaşması süreci boyunca anlatım yaptığıdır (Bione ve diğ., 2004). Moleküler genetik mutasyon analizleri POY fenotipinde *DACH2*'nin varlığı kanıtlanmıştır (Mumm ve diğ., 2001; Prueitt ve diğ., 2002); fakat *POF1B* henüz gösterilmemiştir (Bione ve diğ., 2004).

Dişi folikülogenez genleri X kromozomu üzerinde yoğunlaşmış olup, mutasyon durumunda POY sendromu nedenlerinden olabilmektedir. Dişi eşey kromozomu; yumurtalık fonksiyonunu teşvik eden fizyolojik süreç olan "folikülogenez" ve eşey hücresi olgunlaşma süreci "oogenez" (embriyo gelişiminde ve döllenmeye hazır, olgun oositin oluşmasını sağlayan süreç) için önemli role sahiptir (Fassnacht ve diğ., 2006).

2.4.2. TGF- β (Transforming Growth Factor- β) Gen Ailesi

Yumurtalık fonksiyonu koordinasyonunda “hipotalamus-hipofiz-ovaryum” gibi endokrin sisteme ilave olarak folikülogenez ve oogeneze süreçlerinde folikül çevresindeki otokrin ve parakrin düzenlenmesi de önem taşımaktadır.

Folikülogenez ve oogeneze süreçlerindeki pek çok anahtar düzenleyicilerin anlatımı oosit ve granül hücrelerinde yapılır, bu düzenleyiciler Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ailesi üyeleridir (Juengel ve McNatty, 2005). 35 üyeli aile; *activin / inhibin*, *TGF- β* , *Bone Morphogenetic Protein (BMP)*, *Growth Differentiation Factor (GDF)* alt ailelerinden oluşur (Chang ve diğ., 2002).

Bu üyelerin pek çoğu insanda folikülogenez sürecinde önemli biyolojik role sahiptir. POY’da rolü olduğu düşünülen en önemli genler; *BMP15*, *GDF9* ve *INH α* ’dır.

***BMP15* geni *GDF9B* olarak da adlandırılır.** İki ekzondan oluşur ve Xp11.2’de yer alır (Dube ve diğ., 1998). *BMP15* gen anlatımı erkek ve dişi gonadlarında sınırlıdır. *BMP15* proteini büyük primer foliküllerdeki oositler içinde lokalize olur, henüz küçük primer foliküller içinde yer aldığı görülmemiştir (Aaltonen ve diğ., 1999). Oositlerdeki *BMP15* proteinin üretimi, folikül gelişimiyle birlikte artış gösterir (Otsuka ve diğ., 2000).

BMP15, primer foliküllerde anlatımı yapılan oosit türevli bir faktördür. Koyunlarda X’e bağlı olarak belirlenen *BMP15* mutasyonunun dişi fertilitesinde önemli bir faktör olduğunu ortaya çıkarmıştır (Galloway ve diğ., 2000). *BMP15* de dozaj etkisi mevcuttur, heterozigot bireylerde ovulasyon oranında artışa bağlı olarak çoğul gebelikler gelişirken homozigot mutantlarda folikül gelişimi primer aşamada durdurulmaktadır. *BMP15*’in rolü tam olarak açıklanmamış olmasına rağmen, sıçan granül hücrelerinde FSH reseptör ekspresyonunu baskılayarak FSH etkisini değiştirdiği gösterilmiştir (Otsuka ve diğ., 2001b).

Yumurtalıkta BMP sinyal yolunun önemine yönelik, BMP reseptörlerinde mutasyon analizleri ve fonksiyon kaybı çalışmaları yapılmıştır. *BMPRIIB* kusurlu farelerde yapılan çalışmada *BMPRIIB* sinyal yokluğunun infertiliteye yol açtığı gösterilmiştir (Yi ve diğ., 2001).

İnsanlarda *BMP15* geninin, oogenez üzerindeki etkisi iki kız kardeşte tanımlanmıştır. Normal karyotipli (46,XX) olan kız kardeşlerin, hipoplastik gonadlara ve primer amenore'ye sahip oldukları belirtilmiştir. Bir heterozigot varyant da *BMP15* geninde Tyr-235-Cys tek aminoasit değişikliğinin etken ajan olduğu düşünülmektedir. Etkilenmemiş anne *BMP15* genomik dizisini genel populasyondaki gibi taşıırken, sağlıklı baba mutasyona uğramış varyantı hemizigot olarak taşımaktadır (Di Pasquale ve diğ., 2004). *BMP15* geninin fonksiyonu sadece dişi eşey hücresiyle sınırlı olmayıp, ilişkili gonad dokularında da anlatımı yapılmaktadır (Fassnacht ve diğ., 2006).

GDF9 geni, iki ekzon tarafından kodlanır ve 5q23.3'de yer alır. Farelerde, *Gdf9* geni primordiyal foliküller hariç folikülogenezin tüm aşamalarında oositlerde anlatım yapmaktadır (McGrath ve diğ., 1995). *Gdf9* knockout dişi farelerde sadece primordiyal ve primer foliküller geliştiğinden kısırılık görülür. Folikül olgunlaşmasındaki aşamaların kaybı göstermektedir ki, *Gdf9* sekonder foliküllerin gelişimi için gerekli anahtar genlerden birisidir (Dong ve diğ., 1996).

GDF9'un üretimi oositlerde yapılır. *GDF9* geninde yapılan hedeflenmiş delesyon çalışmalarında, teka hücrelerinin organizasyonunda aksama, normal olmayan oosit büyümesi ve granül hücre çoğalmasında azalma gibi nedenlerle primer folikül aşamasında folikülogenezin bloke olmasıyla sonuçlanır (Dong ve diğ., 1996). Vitt ve diğ. (2000) tarafından yapılan çalışmada GDF9'un erken folikül gelişimindeki rolü kanıtlanmıştır.

Son çalışmalar göstermektedir ki, GDF9 ve BMP15 proteinleri memelilerde granül hücrelerin gonadotropinle indüklenen farklılaşmasının ve proliferasyonun (çoğalmanın) düzenlenmesinde folikülogenez boyunca birlikte çalışan büyüme faktörleridir (McNatty ve diğ., 2005).

Yumurtalıkta GDF9 ve BMP15 mRNA ve proteinleri pek çok canlı türünde özellikle oositte bulunması, oositin GDF9 ve BMP15 için primer kaynak olduğunu göstermektedir (Juengel ve diğ., 2002; Wang ve Roy, 2004).

Bugüne kadar çalışılan tüm memeli türlerinde, GDF9 ve BMP15'in büyümekte olan foliküllerde oositlerde lokalize olması, bu büyüme faktörlerinin memelilerde foliküler gelişimin düzenlenmesinde merkezi role sahip olduğunu göstermektedir. Buna ilaveten

BMP15'in değil ama GDF9'un bazı türlerde folikül oluşumunda rol alabileceği söylenmektedir (Juengel ve McNatty, 2005).

TGF- β ailesi çok sayıda yapısal olarak ilişkili polipeptidlerden oluşur (Massague, 1998). Hücre soyunda çoğalma, farklılaşma, adhezyon, hareket ve apoptoz gibi pek çok aktivite yönünden etkileyebilirler. TGF- β ailesinden çoğu üyenin *in vitro* çalışmalarda foliküler hücreleri ve *in vivo* folikülogenezi etkilediği gösterilmiştir (Richards, 2001; McNatty ve diğ., 2002).

Aktivin, yumurtalıkta en çok çalışılan TGF- β ailesi üyesidir. Radyoaktif işaretlenmiş aktivinle yapılan çalışmalarda ovaryum siklusu tüm aşamalarında sıçan granül hücreleri üzerinde ve gelişmekte olan foliküllerde teka hücrelerinde aktivin bağlanma bölgeleri gösterilmiştir (Woodruff ve diğ., 1993). Bununla ilişkili olarak da aktivin reseptör mRNA'ları sıçan, insan ve fare yumurtalıklarında değişik gelişim aşamalarında belirlenmiştir (Sidis ve diğ., 1998; Peng ve diğ., 1999; Drummond ve diğ., 2002b).

Inhibin α geni (INH α) 2. kromozom (2q33- q ter) üzerine yerleşmiş iki ekzon içerir. Inhibin, granül hücreleri tarafından üretilir. Diğer TGF- β ailesi üyelerinin aksine inhibin endokrin etkiye sahiptir, dolaşımında serbest bırakılarak hipofiz ön kısmından FSH salgılanmasını baskılar (Findlay, 1993).

Inhibin, dişi üreme siklusunun en önemli düzenleyicilerinden birisidir. Bir α alt birimi, bir de 2 adet β alt biriminden (β A ya da β B) birini içerir. β alt birimine bağlı olarak protein Inhibin A ya da Inhibin B olarak adlandırılır. Inhibin proteini, hipofiz FSH sekresyonunu azaltarak yumurtalık granül hücrelerinde üretilir (Halvorson ve DeCherney, 1996). Inhibin, büyüme ve farklılaşma faktörü olarak da rol oynar (Findlay ve diğ., 2002).

POY'lu hastalarda *INH α* dizisi mutasyon için tarandığında gen dizisine göre ikinci ekzonda polimorfizm saptanmıştır (769 G \rightarrow A). G \rightarrow A değişimiyle 257. pozisyonda alaninin treonine dönüştüğü bölge, *INH α* proteinin oldukça korunmuş dizisi içerisinde yer alır (Shelling ve diğ., 2000).

Klinik semptomları ortaya çıkmamış pre-menopozlu kadınlarda, yumurtalıktaki foliküllerde yeterli azalma olana kadar kan serumundaki inhibin düzeyi azalmaya devam eder. Bu yüzden, Inhibin yumurtalıktaki folikül kapasitesini belirlemek için “serum markırı” olarak kullanılabilir (Burger ve diğ., 2002).

2.4.3. POY Sendromunda Diğer Önemli İnsan Folikülogenez Genleri

AIRE geni (AutoImmune Regulator gene), 14 ekzondan oluşur, genomik DNA’da 11.9 kb’lık alanda bulunur, 21. kromozomda (21q22.3) yer alır (Nagamine ve diğ., 1997).

İnsanda AIRE proteininin, çok sayıda dokuda nukleusta lokalize olduğu bulunmuştur. Bu durum, gen transkripsiyonunda düzenleyici olarak rol aldığı düşünmektedir. Farelerde yabancı tip Aire proteini güçlü transkripsiyon aktivatörü olarak rol almaktadır (Bjorses ve diğ., 1999; Bjorses ve diğ., 2000). Ayrıca PHD (Plant Homeo Domain) tipi çinko parmak motifleriyle E3 ubiquitin ligaz fonksiyonu görerek ubiquitin proteazom yolunda da yer alır (Uchida ve diğ., 2004).

AIRE genindeki mutasyonlar APECED’e (otoimmün poliendokrinopati-candidiasis-ektodermal distrofi) yol açar. Klinik olarak üçlü patolojiyle karakterize edilebilir: hipoparatiroidizm, primer adrenokortikal yetmezlik ve kronik mukokütanöz kandidiyazis (KMK) (Ahonen ve diğ., 1990). Bu hasta grubunda ovaryum yetmezliğinin görülme sıklığı %60 tahmin edilmektedir (Ahonen ve diğ., 1990).

DAZL geni (Deleted in AZoospermia Like geni), 10 ekzondan oluşur ve 3. kromozomda (3p24) yer alır. 2. kromozomdaki (2q33) **BOULE** ve Y kromozomunun uzun kolundaki (Yq11.23) **DAZ** ile birlikte “**DAZ** gen ailesini” oluşturur. Bu genler; korunmuşluk gösteren, RNA’ya bağlanan protein ailelerini kodlar. Eşey hücrelerinde spesifik olarak anlatım yaparlar ve delesyon, dişi ve erkek fertilitesine zarar verir (Yen, 2004).

Fare modellerinde, erkek ve dişi homozigot *Dazl* knockout farelerin kısır olduğu gösterilmiştir (Ruggiu ve diğ., 1997). Embriyonik ve ergenlik öncesi yumurtalıklarda, Dazl proteini oosit sitoplazmasında ve granül hücrelerinde bulunmuştur. Yetişkin foliküllerdeki lokasyon, oosit olgunlaşmasıyla üretilen zona pellusida ile ilişkilidir. İnsanlarda, **DAZL** mRNA’sı testis ve ovaryum dokularında çok miktarda bulunmasına rağmen; kalp, karaciğer,

beyin gibi diğer dokularda bulunmaz (Dorfman ve diğ., 1999). Protein; primer, sekonder, tersiyer foliküllerdeki oosit sitoplazmasında (Dorfman ve diğ., 1999; Nishi ve diğ., 1999) ve korpus luteum'da ortaya çıkar (Pan ve diğ., 2002).

Bu yüzden *DAZL* geninin dişi ve erkekte eşey hücresi gelişiminin erken aşamalarında rol oynadığı düşünülerek, yokluğunda patolojik POY fenotipine yol açabileceği ileri sürülmektedir (Fassnacht ve diğ., 2006).

***DBX* geni** (DEAD-Box 3, X-linked gene), 17 ekzondan oluşur ve X kromozomunun kısa kolunda yer alır (Xp11.23-p11.3) (Park ve diğ., 1998).

Büyük protein ailesi olan DEAD-box proteinlerinin üyesidir. Bu proteinler, ATP bağlama domeni gibi fonksiyonel olan korunmuş dizi motifini Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) içeren RNA helikazlardır (Rocak ve Linder, 2004). Hücrel RNA metabolizmasının her sürecinde yer alırlar: transkripsiyon, kırılma, ribozomal biyogenez, RNA eksportu ve translasyon. İnsanlardaki tüm DEAD-box RNA helikazları *DDX* gen ailesi sembolü altında kategorize edilir ve her spesifik *DEAD-box* geni farklı bir numarayla bulunur (Abdelhaleem ve diğ., 2003).

DBX geni yüksek korunmuşluk gösterir, mayadan insana kadar homologları bulunmuştur. *Drosophila*, kurbağa, zebrafish ve fare dişi eşey hattında *DBX* homolog genlerinin anlatım yapması, bu fonksiyonun korunmuş olduğunu göstermektedir (Olsen ve diğ., 1997; Johnstone ve diğ., 2005).

İnsan *DBX* geninin de insan folikülogenezinde fonksiyonel rol oynadığı düşünülmektedir. POY gibi dişi fertilitésinin bozulduğu durumlarda, *DBX* delesyonu ya da dişi eşey hattı fonksiyonunu bozan gen mutasyonundan söz edilebilir.

FOXL2 geni (“Forkhead”-Transkripsiyon Faktör Benzeri 2), 3. kromozomda (3q23) yer alır. Tüm ökaryotlarda bulunabilen “Forkhead” proteinleri, omurga ve embriyonik doku gelişiminde önemli rol oynar. İnsanda şimdiye kadar 20’nin üzerinde “forkhead” proteini keşfedilmiş olup, işlev bozuklukları çeşitli tümör etiolojisinde yer almaktadır (Prueitt ve Zinn, 2001).

FOXL2’nin POY ile ilişkisinin araştırıldığı üç çalışmada; 220 POY sendromlu hasta *FOXL2* mutasyonları için taranmış, fakat herhangi bir gen mutasyonu saptanmamıştır (De Baere ve diğ., 2002; De Baere ve diğ., 2003; Bodega ve diğ., 2004).

FSHR geni (Folikül Uyarıcı Hormon Reseptör), FSH reseptörünü kodlar ve 2. kromozomda yer alır (2p21-p16). 10 ekzondan oluşur ve genomik DNA’da 54 kb boyutundadır (Gromoll ve diğ., 1996). FSHR proteininin 7 adet trans-membran segmenti içerdiği düşünülmektedir. Ayrıca dişi ve erkek üreme siklusunun kontrolünde en önemli hormonlardan biri olan FSH’a bağlanır.

FSHR genindeki mutasyonlar, prematür ovaryum yetmezliğini de içeren fizyolojik fonksiyonunda çeşitli değişikliklere yol açar. FSHR bozukluğunun derecesine bağlı olarak mutasyonlar primer ya da sekonder amenore (adet kesilmesi) ile sonuçlanabilir ve sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişiminde değişikliklere yol açabilir (Aittomaki ve diğ., 1996).

GALT geni (Galaktose-1-Fosfat Uridiltransferaz), 9. kromozomda (9p13) yer alır (Kondo ve Nakamura, 1984). 11 ekzondan oluşur ve yaklaşık 4kb uzunluğundadır (Flach ve diğ., 1990). GALT enzimi, galaktoz-1-fosfat ve glukoz-1-fosfat arasında uridin monofosfat transferiyle karşılıklı dönüşümü katalizler.

GALT genindeki mutasyonlar galaktozemiye yol açar. Besinden galaktoz uzaklaştırılmadığında büyüme ve mental retardasyon ile karakterizedir. Galaktozemi’ye yol açan 150’den fazla *GALT* geni mutasyonu rapor edilmiştir. Bunların içinde POY sendromu oluşumuyla en ilişkisi homozigot mutant genotip Q188R / Q188R’dir. Galaktozemili pek çok kadının POY geliştirmede yüksek risk taşıdığına yönelik raporlar mevcuttur (Guerrero ve diğ., 2000).

USP9X geni (Ubikutine özgü proteaz 9, X-linked), X kromozomunda *DBX* geni yanında yer alır (Xp11.4) ve ubikutin-özgü proteaz kodlar (Jones ve diğ., 1996).

USP9X proteini ubikutin uzaklaştıran, substrat spesifik sistein-proteazlardır ve hücre siklusu, apoptoz ve sinyal iletim yolları gibi pek çok hücre içi süreci kontrol eden hücreyel ubikutin metabolizmasının düzenlenmesinde yer alır (D'Andrea ve Pellman, 1998).

DBX geni gibi *USP9X* geni de X kromozomunda X inaktivasyonundan kaçan Xp11.4 bölgesinde yer alır (Jones ve diğ., 1996). Bu yüzden bu iki genin Turner-sendromu patogenezinde kritik rol oynayabileceği düşünülmektedir (Fassnacht ve diğ., 2006).

FOXO3 geni (Forkhead box O3), 6q21 bölgesinde yer alır (Hillion ve diğ., 1997; Anderson ve diğ., 1998). *FOXO3* geni farklı bir forkhead domeni ile karakterize olan forkhead transkripsiyon faktörü ailesi üyesidir. Programlı hücre ölümünde önemli genlerin ekspresyonunu sağlayarak apoptozun başlamasında rol alır (Brunet ve diğ., 1999).

POY vakalarında yapılan biyopsi çalışmalarının pek çoğunda primordiyal foliküllerin azaldığı bulunmuştur (Board ve diğ., 1979; Russell ve diğ., 1982). Oosit apoptozu (Tilly, 2000) ve folikül başlangıcı olarak da bilinen (McGee ve Hsueh, 2000), primordiyal folikül aktivasyonu (PFA) mekanizmaları primordiyal foliküllerin azalmasında görev alan fizyolojik süreçlerdir. Gerek oosit apoptozu gerekse de PFA, menopoz öncesi süreçte devam eder. Bir kadının yaşam sürecinde bu mekanizmalarda oluşan kusurlar kümülatif (birikerek artan) etki yaratarak primordiyal foliküllerin sayısını ve dolayısıyla menopoz yaşını etkiler (Gallardo ve diğ., 2008).

Forkhead transkripsiyon faktörü Foxo3'un, primordiyal folikül aktivasyonunda düzenleyici rol oynadığı gösterilmiştir (Gallardo ve diğ., 2008). Castrillon ve diğ. (2003) tarafından fareler üzerinde yapılan çalışmada Foxo3 fonksiyon kaybının doğumdan birkaç gün içinde PFA neticesinde POY'a neden olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, insan ortolog FOXO3'ündeki (aminoasit düzeyinde %95 benzerlik gösterir) mutasyon ya da doğal meydana

gelen polimorfizmlerle POY'a ve menarşdan önce primordiyal folikül tüketimiyle ilişkili olan primer amenoreye neden olduğu olasılığını arttırmaktadır (Timmreck ve Reindollar, 2003).

Diego Castrillon ve diğ. (2003), fertilitéyle ilişkili genlerden *Foxo3a* ile fareler üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda *Foxo3a*'nın foliküllerin kontrol altında tutulmasında rol aldığını göstermesi, POY'lu kadınların daha yüksek oranda foliküler aktivasyona sahip olabileceklerini düşündürmektedir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7: Foxo3a mutant ve normal farelere ait yumurtalıklar (Castrillon ve diğ., 2003).

Sağdaki Foxo3a içermeyen yumurtalıklarda fazla miktardaki foliküller nedeniyle şişkinlik görülmektedir.

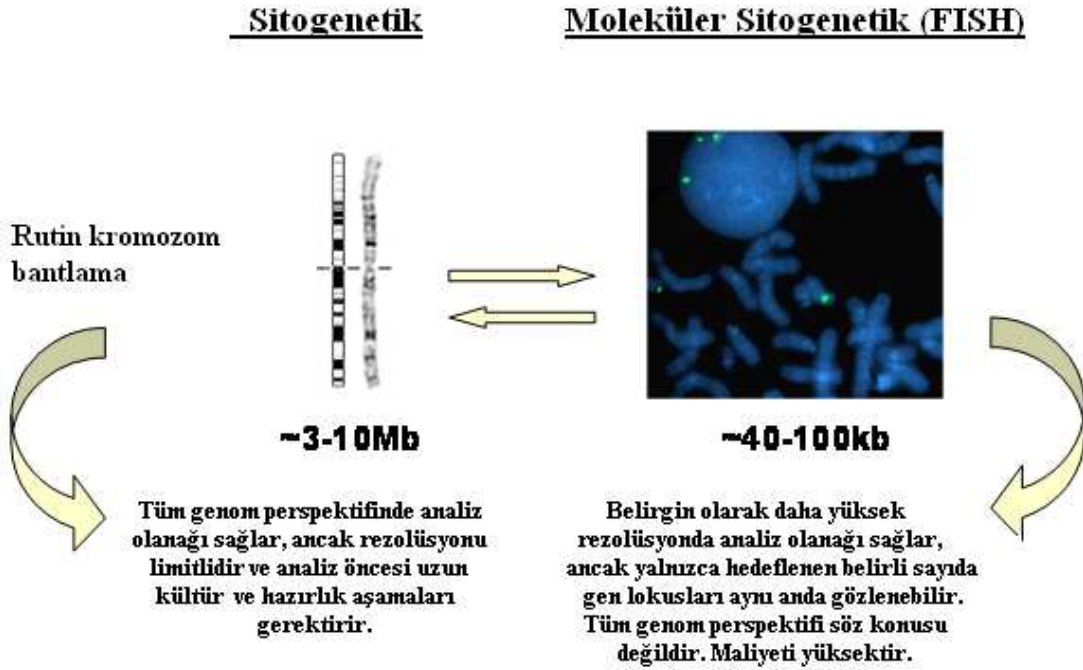
NOBOX (yenidoğan yumurtalık “homeobox” gen) oosite özgü bir “homeobox” geni olup folikülogenezin erken aşamasında kritik role sahiptir ve sendromik olmayan ovaryum yetmezliği için aday genlerden birisidir. İnsanda 7. kromozom üzerinde 7q35 de yer alır. İnsan yumurtalıklarıyla çalışma pek mümkün olmadığından ovaryum gelişimine yönelik bilgilerin çoğu hayvan modelleriyle yapılan çalışmalardan elde edilmektedir (Pangas ve Rajkovic, 2006). Fareler üzerinde yapılan knockout çalışmaları ve koyunlarda doğal yolla meydana gelen mutasyonlar ovaryum yetmezliğine yönelik aday genlerin belirlenmesinde önemlidir (Shiina ve diğ., 2006; Bodin ve diğ., 2007).

İnsan ve farelerdeki **NOBOX** geninin anlatımı özellikle oositlerde yapılır ve homeobox transkripsiyonel regülatörü kodlar (Suzumori ve diğ., 2002; Huntriss ve diğ., 2006). Yetişkin

insan dokularındaki özellikle de insan gonadlarındaki *NOBOX* anlatımı, farelerdekiyle benzerlik gösterir (Huntriss ve diğ., 2006). İnsan yumurtalığındaki anlatım oosite özgüdür, primordiyal foliküllerden metafaz II oositlerine kadar gözlenir. Farelerde *NOBOX* homeodomeninin TAATTG ya da *Gdf9* (MIM 601918), *Pou5f1* (MIM 164177) gibi elementlere bağlandığı gösterilmiştir (Choi ve Rajkovic, 2006).

2.5. ARRAY-TEMELLİ CGH (aCGH) TEKNOLOJİSİ

Geleneksel sitogenetik analizi, mikroskopik kromozomal değişimlerin belirlenmesine olanak vermiştir (Caspersson ve diğ., 1968; Trask, 2002). Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ve diğer moleküler metodolojilerin gelişmesiyle submikroskopik değişimlerin saptanması mümkün olabilmıştır (Şekil 2.8.) (Prooijen-Knegt ve diğ., 1982). Buna ilave olarak geliştirilmiş olan karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) yöntemi, iki farklı genomu DNA kopya sayısı farklılıklarına göre karşılaştırma temeline dayanmaktadır. İlk geliştirildiğinde CGH analizi için substrat olarak normal metafaz kromozomları kullanılmıştır (Kallioniemi ve diğ., 1992). Daha sonraki çalışmalarda CGH metodu, kromozomal dengesizliklerin saptanabilmesi için büyük genomik klonlardan oluşturulan mikroarraylere (aCGH) uygulanmıştır. Array CGH, geleneksel sitogenetik ve moleküler sitogenetik tekniklerin üzerinde avantajlara sahiptir (Shaffer ve Bejjani, 2004). aCGH yönteminde, analiz için hedef olarak küçük DNA segmentlerinin yer aldığı array lamaları kullanılır (Lucito ve diğ., 2003). Bu mikroarrayler küçük miktarlardaki DNA örneklerinin (probların), cam gibi katı bir yüzeye belirli sırada sabitlenmesiyle oluşturulur. Probların boyutları ilgilenilen bölgeye göre değişmekle birlikte, 25-85 baz çiftinden oluşan oligonukleotidlerin yer aldığı oligoarrayler ve 80,000-200,000 baz çiftinden oluşan bakteriyal yapay kromozomların yer aldığı genomik arraylere kadar çeşitlilik göstermektedir. Rezolüsyon derecesi, prob boyutu ve genomda DNA probları arasındaki mesafeyle değerlendirilir. Kullanılan problar, metafaz kromozomlarından önemli ölçüde küçük boyutlarda olduğundan teorik açıdan da aCGH, rezolüsyon bakımından geleneksel CGH'e göre üstünlük taşır (Theisen, 2008).



Şekil 2.8: Geleneksel Sitogenetik ve Moleküler Sitogenetik yöntemlerin karşılaştırılması.

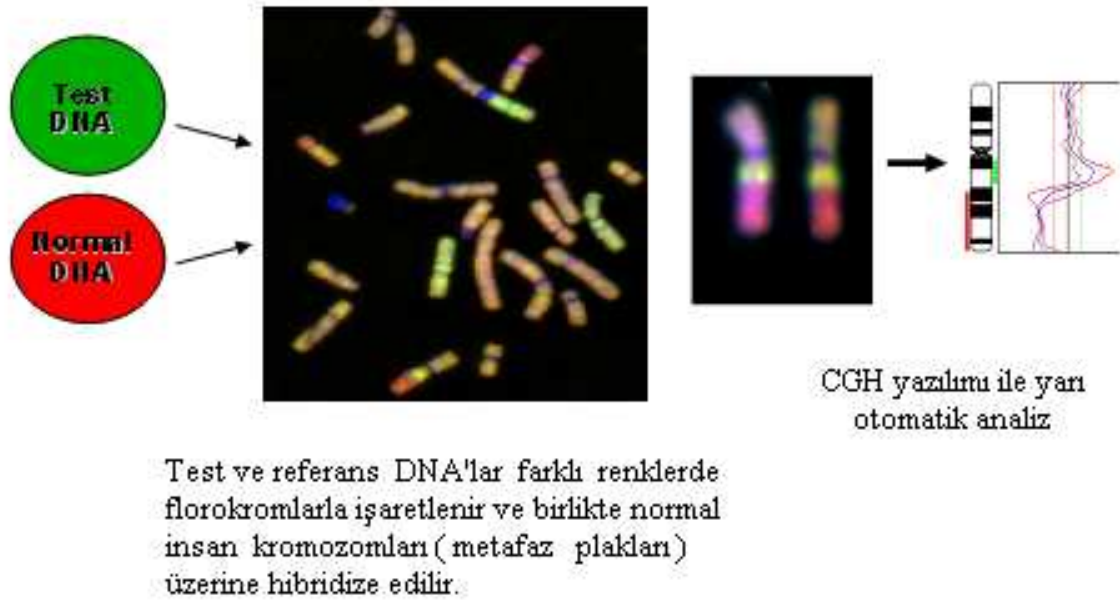
2.5.1. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH) Yöntemi

Sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemlerin dayandığı teknolojiden kaynaklanan bazı sınırlamaları ortadan kaldıracak bir moleküler genetik/sitogenetik yöntem olarak “karşılaştırmalı genomik hibridizasyon” (CGH) ortaya çıkmıştır (Kallioniemi ve diğ., 1992). CGH yöntemi, hem klasik sitogenetik yönteminin sahip olduğu tüm kromozomları bir arada inceleyebilme, başka bir deyişle tüm genom perspektifinde analiz özelliğini daha detaylı bilgi sahibi olunacak şekilde geliştirmekte, hem de FISH yönteminin kullandığı floresans işaretleme ile FISH kadar detaylı olmamakla birlikte anomali saptanan kromozom bölgesinin yeri hakkında daha net bilgi verebilmektedir.

CGH yönteminde, araştırılan örneğe ait DNA (test DNA) ile normal olduğu bilinen bir DNA örneği (referans DNA) farklı renklere boyanarak floresansla işaretlenerek yine normal olduğu bilinen insan kromozomları (metafaz plakları) üzerine birlikte hibridize edilmektedir. 72 saat

süren hibridizasyon süresini takiben floresan mikroskop ile önce metafaz plakları bir görüntü analiz sistemi yardımıyla kaydedilmekte, sonra bu metafaz plaklarındaki kromozomlar özel bir CGH yazılımı aracılığıyla sıraya dizilmektedir. Her bir kromozom üzerindeki, olması gereken karışım renkten florokromlardan birisi lehine sapmalar aynı yazılım tarafından değerlendirilerek o kromozom bölgesine ait test DNAsındaki kopya sayısı artışı (amplifikasyon) ya da eksilmesini (delesyon) göstermektedir (Şekil 2.9.) (Weiss ve diğ., 1999).

Aynı sonucun değerlendirilen diğer metafaz plaklarında da gözlenmesi bulgunun doğruluk değerini yükseltmektedir. Ancak klasik CGH yöntemi zorluğu ve değerlendirme kriterlerinin güçlüğü nedeniyle pratik uygulamada yaygınlaşamamıştır.



Şekil 2.9: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH)

(Tüm genom ölçeğinde kopya sayısı değişikliklerini saptamaya yarayan bir tekniktir ancak FISH kadar hassas değildir ve daha zor bir uygulamadır.)

CGH yönteminin artılarını daha da geliştiren, hassasiyet ve özgüllüğünü artıran, uygulama ve değerlendirme zorluklarını ise azaltan bir yöntem olan MikroArray CGH yöntemi üzerinde çalışmalar tüm dünyada sürmekte birlikte bugün gelinen nokta itibarıyla şu teknolojik karşılaştırma yapılabilir:

- Her iki yöntem de tüm genom perspektivinde inceleme olanağı sağlamaktadır.
- Her iki yöntemde de test ve referans DNA lar farklı renklerde florokromlarla işaretlenmektedir.
- CGH yönteminde hibridizasyon normal insan metafaz plakları üzerine yapılırken, MikroArray CGH yönteminde bu işlem özel olarak tasarlanmış ve arzu edilen DNA parçaları arzu edilen sayılarda spot edilmiş array'ler üzerine yapılmaktadır.
- CGH yönteminde hibridizasyon süresi 72 saat iken MikroArray CGH yönteminde 16 saattir.
- CGH yönteminin analizinde bir floresan mikroskop ve gerekli filtrelere, bir kamera ve görüntü analiz sistemine ve CGH analiz yazılımına gereksinim vardır. MikroArray CGH için yalnızca bir mikroarray tarayıcıya ve mikroarray analiz yazılımına ihtiyaç vardır.
- CGH yöntemini doğru analiz edebilmek için özel eğitilmiş personele, metafaz plaklarından kromozomları doğru olarak dizmeye, pek çok metafaz plağını ayrı ayrı değerlendirip sonra tüm sonuçları karşılaştırmaya yani saatler süren bir analiz süresine gerek vardır. MikroArray CGH yönteminin değerlendirilmesi tam otomatik olarak yapıldığından özel eğitime ihtiyaç göstermediği gibi analiz süresi dakikalarla sınırlıdır.

2.5.2. Array CGH Yöntemi

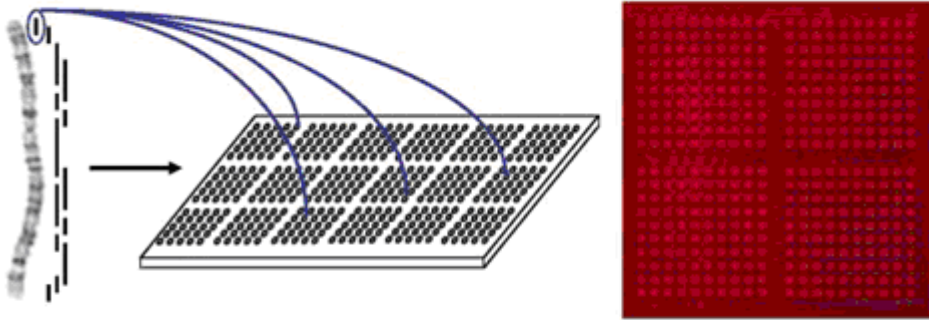
CGH yöntemi, zorluğu ve değerlendirme kriterlerinin güçlüğü nedeniyle pratik uygulamada yaygınlaşmamıştır. Günümüzde hem daha hızlı sonuç alınabilen, hem de analiz aşamasının tam otomatik olarak gerçekleştirilebildiği MikroArray CGH yöntemi araştırmacıların çalışmalarını yoğunlaştırdıkları bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır.

Delesyon ve duplikasyon gibi kromozom anomalileri, normal gen dozajındaki dengesizlikten dolayı spesifik ve kompleks fenotiplerle sonuçlanır. Rutin kromozom bantlaması 5-10 Mb'dan küçük kromozomal değişimleri belirlemede yeteri kadar hassas değildir. CGH, test örneği ile kontrolü DNA içerik farklılıklarına göre karşılaştırarak tüm genomu taramak için geliştirilmiştir (Jeuken ve diğ., 2002). Son zamanlarda, hibridizasyon için hedef olarak boyutu büyük DNA parçalı genomik klonları (Bakteriyal yapay kromozomları / P1 yapay

kromozomları) (BACs/PACs) ya da daha küçük PCR ürünlerini içeren DNA mikroarrayleri geliştirilmiştir (Kraus ve diğ., 2003).

Array-temelli karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (array CGH), kromozomal dengesizliklerin yüksek çözünürlükte belirlenmesine olanak tanıyan güçlü bir yeni teknolojidir. Farklı işaretlenmiş test ve kontrol DNA'larının genomik klonları içeren bir mikroarray üzerine birlikte hibridize edildiği bir yöntemdir (Şekil 2.10).

A.



Klonlanmış insan
DNA'sı (BAC / PAC)

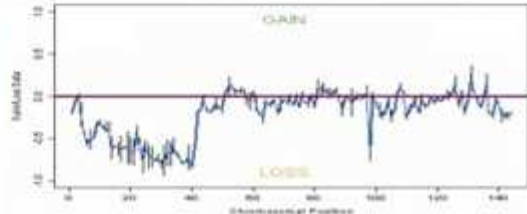
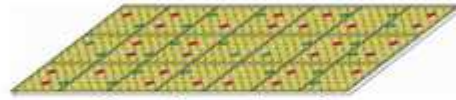
Klonların array lamına
basılması

B.

Kontrol (referans)
genomik DNA



Test (hasta)
genomik DNA



Şekil 2.10: A. BAC/PAC array üretimi, B. Üretimi yapılan arrayde aCGH çalışması (Shaffer ve Bejjani, 2004).

Array-temelli CGH (array CGH); yüksek kapsamlı, çok yüksek çözünürlük, hassasiyet ve hız gibi özelliklerinden dolayı gerek geleneksel CGH gerekse de günümüzdeki tanı metodlarından daha avantajlıdır (Bruder ve diğ., 2001). Array CGH, BAC ya da PAC gibi harita bilgisi olan boyutu büyük DNA parçalı genomik klonları kullandığından, değişiklikler doğrudan genetik markırlara bağlanabilir ve genomik çözünürlük, markırlar (target, hedef) arasındaki harita mesafelerinden ya da kullanılan klonların boyutlarından saptanabilir (Pinkel ve diğ., 1998).

Array CGH, çeşitli tümör örneklerinin genomik profilinin oluşturulmasında başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Wilhelm ve diğ., 2002). Array CGH uygulamasına yapısal kromozom anormalliklerinin tek kopya delesyon ya da duplikasyonlar halinde gösterilmesinde başvurulmuştur (Veltman ve diğ., 2002). Bununla birlikte, array CGH teknolojisi hala gelişmekte olan ve metodolojiyle ilişkili bazı yaklaşımların henüz çözülemediği bir teknolojidir.

2.5.3. Kopya Sayısı Değişiklikleri, “CNV” (Copy Number Variations)

Kopya sayısı değişimi (CNV), referans bir genomla karşılaştırıldığında değişken kopya sayısına sahip, 1 kb'dan uzun DNA segmenti şeklinde tanımlanır (Feuk ve diğ., 2006; Freeman ve diğ., 2006). Başlangıçta klinik olarak önemsiz olduğu düşünülen CNV, hastalığa dönüşme etkinliği olan CNV'ye dönüşebilir. Bu yüzden mikrolelesyon ve mikroduplikasyon sendromlarına neden olan dengesizliklerde kullanıldığı gibi (Lee ve Lupski, 2006), hasta ve normal kontrol çalışmalarında kopya sayısı farklılıklarının tanımlanmasında da kullanılmaktadır (Scherer ve diğ., 2007).

Array CGH verisi analiz edilirken, klinik sitogenetikçiler CNV'yi “benign” (zararsız), patolojik ve klinik önemi bilinmeyen CNV şeklinde sınıflandırırlar. Genomik dengesizlik klinik olarak etkilenmiş bir bireyde ve sağlıklı aile üyelerinden birinde saptanmışsa “benign” CNV olarak değerlendirilir. Mikrolelesyon ya da mikroduplikasyon sendromlarıyla ilişkili kritik bölgelerle çakışan (ya da klinik önemi olan subtelomerik bölgelerle çakışan) CNV'ler “patolojik” olarak adlandırılmaktadır. Genomik bir değişikliğin patolojisini belirlemedeki kriter, standart kromozom bantlama ya da array CGH analizleriyle değerlendirilebilmektedir (Shaw-Smith ve diğ., 2004; De Vries ve diğ., 2005; Friedman ve diğ., 2006).

3.1. POY TANISINA YÖNELİK MİKRODİZİN BAZLI KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYON KİTİ TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ

3.1.1. Kullanılan Hücre Soyu ve Genomik Klonların Temini

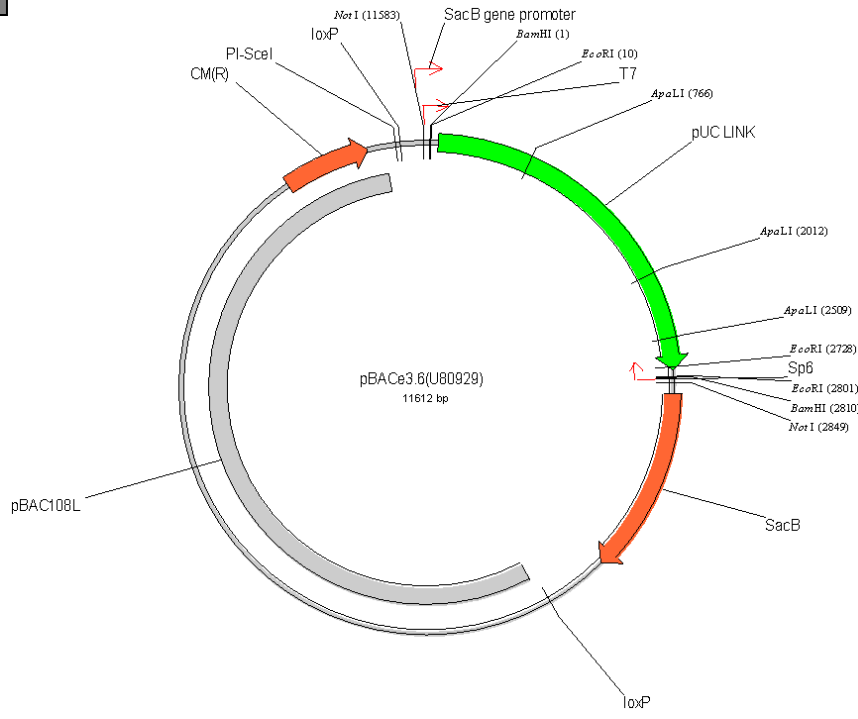
Literatür araştırması sonucunda POY ile ilişkili olduğu belirlenen gen ve gen dışı bölgelere ait büyük DNA parçalarını içeren BAC / PAC klonları (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), ATL R&D Laboratuvarı, Paris den temin edildi.

Siparişi verilen BAC / PAC klonları, “Children’s Hospital Oakland Research Institute” (CHORI) laboratuvarlarında Kazuytoyo Osoegawa ve Minako Tateno tarafından oluşturulan genomik klon kütüphanelerinde, “Roswell Park Cancer Institute” (RPCI) koleksiyonunda yer almaktadır (Tablo 3.2). DNA örnekleri *EcoRI* kesim bölgesinden pBACe3.6 vektörüne (Şekil 3.1.A) klonlanmış DH10BTM *E.coli* hücrelerine transformasyonu yapılmış ve 384 kuyucuklu mikroplaklarda kütüphane oluşturulmuştur (<http://www.chori.org/bacBAC/home.htm>).

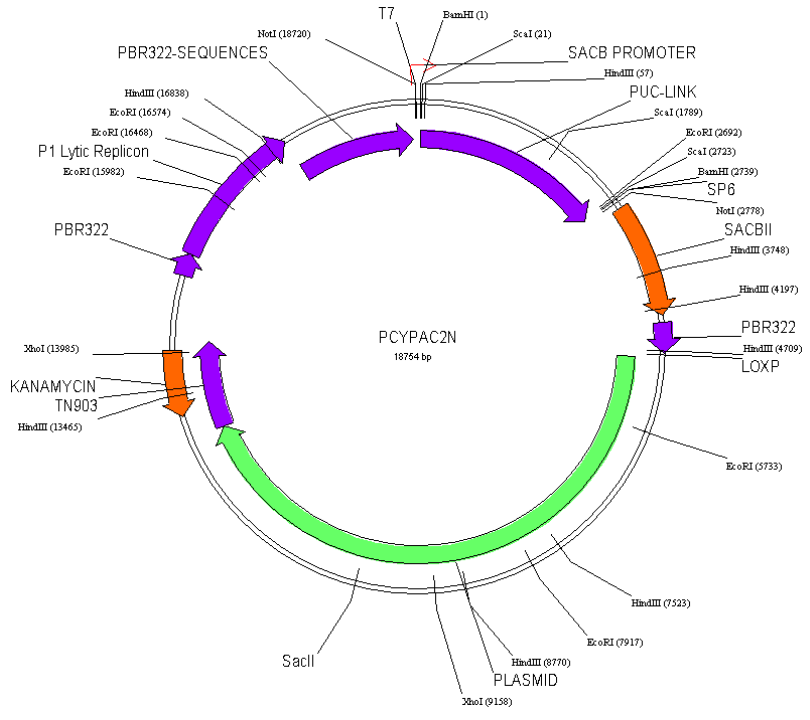
Tablo 3.2: BAC ve PAC klon koleksiyonunun oluşturulmasına ait genel bilgi

Kaynak(İnsan)	Vektör	Klonlanan ortalama	
		DNA boyutu	Konak organizma
RPCI-11 BAC klon kütüphanesi İnsan embriyonik beyaz kan hücreleri (1-1152, 384 kuyucuklu mikroplak)	pBACe3.6	174 kb	DH10B TM
RP PAC klon kütüphanesi RPCI-1 plak no: 1-321 RPCI-3 plak no: 322-528 RPCI-4 plak no: 529-816 RPCI-5 plak no: 817-1200 (İnsan embriyonik hücreleri)	pCYPAC2	~115 kb	
RPCI-6 plak no: 1-240 (İnsan kadını hücreleri)	pPAC4	135 kb	

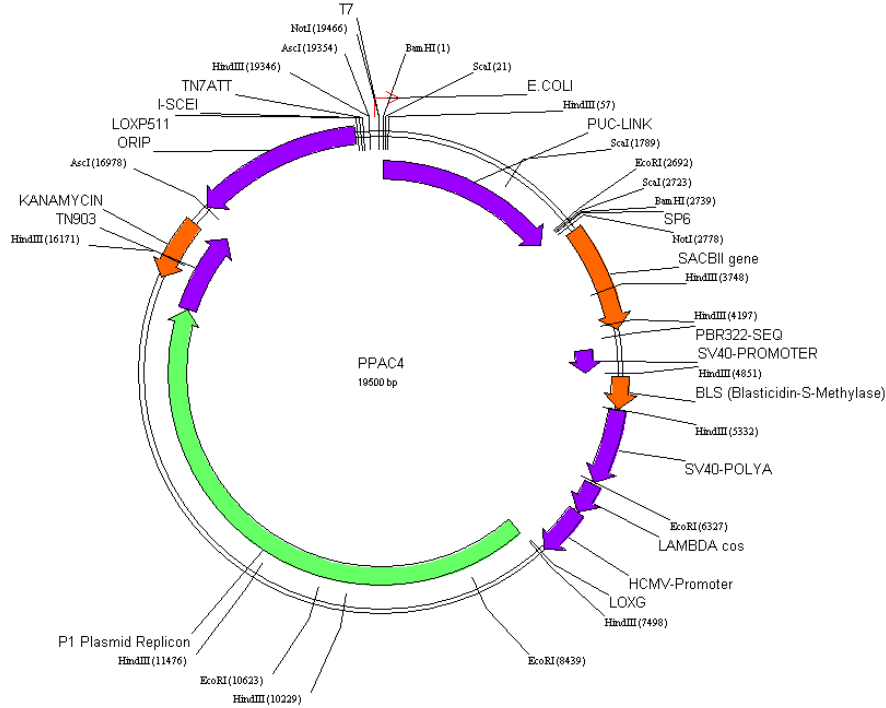
A



B



C



Şekil 3.1: A) pBACe3.6 vektörü, B) pCYPAC2N vektörü, C) pPAC4 vektörü (Invitrogen, USA).

pBACe3.6 klonları kloramfenikol antibiyotiğine dirençlidir. Klonlar, 12,5 µg kloramfenikol / ml içeren LB ortamında üreyebilirler. pPAC4 ve pCYPAC2 klonları da kanamisin antibiyotiğine dirençlidir. Klonlar, 25 µg kanamisin / ml içeren LB ortamında üreyebilirler.

Transformasyonda, transformasyonun sadece elektroporasyonla yapılabildiği, ElectroMAX™ DH10B™ (Invitrogen) *E. coli* hücreleri kullanılmıştır (Calvin ve Hanawalt, 1988; Dower ve diğ., 1988). *mcrA* genotipik markırı ve *mcrBC*, *mrr* delesyonu taşıması, bu ırkı metilsitozin ve metiladenin içeren DNA'nın klonlanması için uygun hale getirmiştir (Raleigh, 1988; Woodcock ve diğ., 1989).

DH10B™ Genotipi: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara, leu*)7697 *galU* *galK* λ - *rpsL* *nupG*

3.1.2. BAC / PAC Klonlarının Kopyalanması

Steril koşullar altında, 96 kuyucuklu mikroplağa, ilgili antibiyotiği (12,5 µg/ml Kloramfenikol, 70 µg/ml Kanamisin) içeren 75 µl Luria-Bertani (LB) besiyeri (Tablo 3.2) her kuyucuğa çok kanallı pipet ile konuldu. -80°C deki ana klon stoğunu içeren mikroplak kısa süreli santrifüj yapıldı. Klonların kopyalanmasında kullanılan replikatör, üç kez absölu etanole batırılıp alevden geçirilerek steril edildi. Steril edilen replikatör ile BAC / PAC klonlarını içeren mikroplaktan, LB + antibiyotik karışımını içeren mikroplağa ekim yapıldı. Ekim yapılan mikroplak 37°C deki çalkalayıcıda bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

3.1.3. Hücrelerin Zengin Besiyeri Ortamına Alınması

3.1.3.1. 2 ml lik Kültür Hazırlığı (Maxi prep.)

Bir gece 37°C de inkübasyona bırakılan mikroplak, mikroplak çalkalayıcıdan alınarak +4°C ye kaldırıldı. Gözlenen bulanık sarı renk üremenin gerçekleştiğini gösterdi. Üreme değeri mikroplak okuyucuda (spektrofotometre) 490 nm dalga boyunda ölçüm alınarak belirlendi. 2 ml lik (96 kuyucuklu) mikroplak, ilgili antibiyotiği (12,5 µg/ml Kloramfenikol, 70 µg / ml Kanamisin) içeren TB (EZMix Terrific Broth, SIGMA) ile dolduruldu (Tablo 3.3). +4°C ye kaldırılmış olan mikroplak alınarak 3000 rpm ye kadar kısa süreli santrifüj edildi. Replikator 3 kez %100 (v/v) lük etanol ve ateşten geçirilerek steril edildi ve laminar flow içinde soğumaya bırakıldı. Replikator, bir gün önce ekilen bakteri kuyucuklarına batırılıp, TB + Antibiyotik karışımını içeren 2 ml lik mikroplağa ekim yapıldı ve 37°C deki çalkalayıcıda bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Bir gün önce ekilen bakteri klonlarını içeren mikroplakda her kuyucuğa 75 µl %50 (v/v) lik gliserolden eklenip, pipetaj yapıldı ve -20°C ye kaldırıldı.

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar (Tablo 3.3), 1,2 atm 121°C de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. Antibiyotik solüsyonları 0,45 µm milipor filtre ile steril edildikten sonra uygun konsantrasyonlarda besiyeri ortamına eklendi.

Tablo 3.3: Hücre kültüründe kullanılan besiyeri ve solüsyonlar

Adı	İçeriği
Luria-Bertani Besiyeri (1 lt)	10 g Tripton 5 g maya özütü (Yeast extract) 10 g NaCl
Antibiyotik, 400 ml LB için:	200 µl Kloramfenikol (12,5 µg/ml) 5,6 ml Kanamisin (70 µg/ml)
Terrific Broth (500 ml)	1 paket TB (EZMix Terrific Broth, Sigma) 500 ml distile su
%50 Gliserol (100 ml)	50 ml gliserol 50 ml distile su

3.1.3.2. Hücrelerin Zengin Ortamdan Eldesi

37°C etüvde üreme gerçekleşen mikropalak ile çalışmaya devam edildi. 3600 rpm de, +4°C de, 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak oda sıcaklığında ters vaziyette 30 dakika kurumaya bırakıldı.

3.1.4. BAC / PAC Klonlarından Plazmit DNA İzolasyonu

96 kuyucuklu mikropalakda her kuyucuktaki pellet üzerine 100 µl Solüsyon I (Tablo 3.4) eklenerek, solüsyonun pelletle süspanse olması sağlandı. Mikropalak, 65°C da su banyosunda 40 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 4000 rpm de 15 dakika santrifüj edildi. Pellete hiç dokunmadan üst sıvı 2 ml lik yeni bir mikropalağa aktarıldı. Her kuyucuğa 250 µl %95 (v/v) lik etanol eklendi ve -20°C de 2 saat bekletildi. Süre sonunda 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 250 µl %70 (v/v) lik etanol eklendi. Kısa süreli santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığında ters vaziyette kurumaya bırakıldı. Her kuyuya 50 µl (tuz solüsyon + RNazA) karışımı eklendi (Tablo 3.4). 37°C lik su banyosunda 30 dakika bekletildi. Süre sonunda üzerine 125 µl %95 (v/v) lik etanol ve 5 µl Amonyum asetat (7.5 M) eklendi ve -20°C ye kaldırıldı.

Ertesi sabah, mikropalak -20°C den alınarak 4000 rpm de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve her kuyuya 250 µl %70 (v/v) lik etanol eklendi. Alkolle yıkama gerçekleştirildikten sonra etanol ortamdan uzaklaştırıldı. Mikropalak, 37°C lik etüvde 2 saat

bekletildi. Süre sonunda her kuyuya 50 µl steril distile su eklenip, DNA'nın çözünmesi için 1 gece +4°C de bekletildi.

Tablo 3.4: DNA izolasyonu için kullanılan tampon ve solüsyon içerikleri.

Solüsyon I ve Solüsyon II, 50 ml ye steril distile su ile tamamlandı ve 0.45 µm por çapındaki enjektörlü miliporla filtre edildi.

Solüsyon Adı	İçeriği
Solüsyon I (50 ml)	100 mg Potasyum etil xanthogenate 5 ml Tris-HCl (1M) pH 7.5 1 ml EDTA (0.5M) pH 8.0 2.04 g NaCl
Solüsyon II (50 ml) (Tuz Solüsyonu)	16 ml NaCl (5M) 500 µl Tris-HCl (1M) pH 7.5 10 µl EDTA (0.5M) pH 8.0
Tuz Solüsyonu + RNaz A karışımı	5 ml tuz solüsyonu 25 µl RNaz A (10mg/ml)

3.1.5. Agaroz Jel Elektrofrez

Agaroz jel hazırlanırken, jel kasetine tarak yerleştirildi. %1 (w/v) lik jel hazırlamak için, bir erlene 1 gr agaroz ve 100 ml 0.5X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) (Tablo 3.5) tamponu eklendi ve mikrodalga fırında çözüldü. Yaklaşık 60°C ye soğutulurken, 10 µl Etidyum Bromür (10 mg/ml) eklendi. Jel kasete dökülerek, 30 dakika süre ile donması beklendi ve sonra taraklar çıkarılarak içinde 0.5X TBE tamponu bulunan elektrofrez tankına yerleştirildi.

İzole edilen DNA örneklerinden 4 µl alındı, 3 µl 6x yükleme tamponu (Fermentas) üzerine eklenerek pipetaj yapıldı ve hazırlanan jel kuyucuklarına aktarıldı. DNA örneklerinin boyutlarının belirlenebilmesi amacıyla, ağırlıkları bilinen bir DNA markırı (100 bp, Fermentas) ile birlikte jele yüklendi. 120 V da yürümeye bırakıldı. Bu süre içinde, DNA içeriğinin agaroz jelde elektroforetik olarak ayrılması sağlandı. Bromofenol mavisi, jelin 2/3 lük bölümüne ulaştığında güç kaynağı kapatılarak, jel UV transillüminatörde incelendi.

Tablo 3.5: Agaroz jel için tampon içeriği.

Tampon Adı	İçeriği
TBE (10X) tamponu (1 lt)	108 g Trizma-base, pH 8.0 55 g Borik asit 9,3 g NaEDTA, pH 8.0
0.5X TBE tamponu (1 lt)	50 ml 10X TBE 950 ml distile su
6x yükleme tamponu	10 mM Tris-HCl (pH 7.6) % 0.03 Bromofenol mavisi % 0.03 ksilen siyanol FF % 60 gliserol 60 mM EDTA

3.1.6. BAC / PAC Plazmit DNA sının Çoğaltılması

En az 1 gece + 4°C de bekletilen DNA içeren mikroplak, çalkalayıcıda 5 dakika çalkalandı. Çalışılacak DNA örneklerinden 2 şer µl, 96 kuyucuklu 25 µl hacimli PCR mikroplaklarına aktarılıp kısa süreli santrifüj yapıldı. Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplifikasyon Kiti (Tablo 3.6) (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) prosedürüne uygun olarak, Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 9700 model cihazda BAC / PAC plazmit DNA'sı çoğaltıldı (total genom amplifikasyonu, “wga”). Kit'in önerdiği yöntemeye göre (Estaban ve diğ., 1993; Lizardi ve diğ., 1998; Dean ve diğ., 2001; Nelson ve diğ., 2002), DNA örnekleri üzerine kit içerisinde yer alan “Sample Buffer (örnek tamponu)” dan 9 µl eklendi. Pozitif kontrol için 10 ng/µl konsantrasyondaki lambda DNA'sı (λ DNA), negatif kontrol olarak da steril distile su kullanıldı. 95°C de 3 dakika DNA denatürasyonu gerçekleştirildi. Süre sonunda DNA örnekleri buz üzerine alınarak, her örnek için 9 µl Reaksiyon tamponu ve 1 µl GenomiPhi enzim karışımından olacak şekilde toplam 10 µl reaksiyon karışımı eklendi. 30°C de 2 saat süre ile amplifikasyon gerçekleştirildi (Tablo 3.7). Enzim inaktivasyonu için 65°C de 10 dakika bekletildi ve +4°C ye soğutulularak amplifikasyon reaksiyonu sonlandırıldı. Reaksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirleyebilmek için amplifikasyonu yapılmış DNA örnekleri, kit içerisinde yer alan pozitif kontrol (λ DNA'sı) ve negatif kontrol örneği için %1 (w/v) lik agaroz jel elektroforezi yöntemi uygulandı.

Tablo 3.6: GenomiPhi V2 DNA Amplifikasyon Kiti içeriği.

Reaksiyon bileşenleri	Miktar (500 reaksiyon)
Örnek Tamponu (Sample Buffer)	5 x 0,9 ml
Reaksiyon Tamponu (Reaction Buffer)	5 x 0,9 ml
Enzim karışımı (Enzyme Mix)	5 x 100 µl
Kontrol DNA (Lambda), 10 ng/µl	1 x 20 µl

Tablo3.7: BAC / PAC Plazmit DNA'sının çoğaltılmasında kullanılan PCR programı.

Program türü	Derece (°C)	Süre (dk)
Denatürasyon	95	3
Bağlanma-Uzatma	30	120
Enzim inaktivasyonu	65	10
Sonlandırma	4	∞

3.1.7. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

3.1.7.1. DNA Konsantrasyonunun Spektrofotometrik Tayini

İzole edilen DNA örnekleri UV mikroplağı içinde belirli oranlarda sulandırılarak, spektrofotometre cihazında 260 nm dalga boyundaki Optik Dansite (OD) değeri belirlendi. 260 nm dalga boyunda okunan OD değeri, sulandırma katsayısı ve DNA katsayısı ile çarpılarak derişim µg/ml cinsinden hesaplandı (Maniatis ve diğ., 1989). 260 nm / 280 nm değeri, izole edilen DNA'nın saflığının bir ölçüsü olup, saf DNA için bu değer 1.8 dir.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{Sulandırma oranı} \times 50 \text{ (sabit çarpan)}$$

3.1.7.2. DNA Konsantrasyonunun Florometrik Tayini

Spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçların doğruluğunu konfirme etmek açısından tek zincirli nükleik asitlerin de bulunduğu ortamda çift zincirli DNA'yı pikogram düzeyinde belirleme hassasiyetine sahip Quant-IT™ PicoGreen® dsDNA kiti (Invitrogen, Oregon, USA) ile çalışma yapıldı. Floresan mikroplağı içinde, kitte yer alan standart DNA'nın ve çalışılacak

örnek DNA'larının uygun sulandırılmaları hazırlanarak Picogreen için eksitasyon 480 nm, emisyon 520 nm dalga boylarında florometrik ölçümü alındı.

Kitin önerdiği yonteme göre, TE tamponu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5), Quant-iT™ PicoGreen ajanında DNA örneklerini sulandırmak amacıyla kullanıldı. Kitte yer alan 20X TE tamponu; steril distile su ile 20 kat sulandırılarak 1X TE çalışma solüsyonu hazırlandı. Çalışmada kullanılacak PicoGreen ajanı konsantre DMSO'nun 200 kat sulandırılmasıyla hazırlandı. Miktar tayini yapılacak her bir DNA örneği için 100 µl final hacim olacak şekilde 99,5 µl 1XTE içine 0,5 µl çift iplikli DNA'ya özgü PicoGreen ajanı eklendi. Çalışma solüsyonu, folyoya sarılı şekilde karanlık odada muhafaza edilerek ışıktan korundu.

DNA standart eğrisi oluşturmak için, Quant-iT™ PicoGreen kiti içinde 100 µg/ml olarak bulunan Lambda DNA standartından 2 µg/ml konsantrasyonda çalışma solüsyonu hazırlandı. 1 ng/ml den 1 µg/ml ye kadar sulandırım yapıp 5 noktalı standart eğri oluşturuldu (Tablo 3.8) (Sambrook ve diğ., 1989).

Tablo 3.8: Standart eğri oluşturma protokolü

1xTE (µl)	2 µg/ml DNA stoğu (µl)	Sulandırılmış Pico Green (µl)	Final DNA konsantrasyonu
0	100	100	1 µg/ml
90	10	100	100 ng/ml
99	1	100	10 ng/ml
99,9	0,1	100	1 ng/ml
100	0	100	blank

3.1.8. Mikroarray Basımı İçin Optimum DNA Konsantrasyonu ve Spotlama Tamponunun Belirlenmesi

Mikroarray baskılamasında (spotlama) kullanılacak olan DNA örneklerinin optimum konsantrasyonunun ve optimum baskılama (spotlama) tamponunun belirlenmesi için, çoğaltılmış ve DNA konsantrasyonu PicoGreen yöntemiyle belirlenmiş olan BAC / PAC DNA'larından rastgele seçim yapıp eşit konsantrasyona getirildi. DNA örnekleri farklı baskılama solüsyonları ile karıştırılıp, final hacim 50 µl olacak şekilde 384 kuyucuklu

mikroplağa 500 ng/ml, 1000 ng/ml ve 1500 ng/ml konsantrasyonlarda eklendi. Baskılama tamponu olarak “CapitalBio DNA Spotting Buffer (Pekin, Çin)”, %50 DMSO (dimetilsülfoksit), 3XSSC (sodyum klorür-sodyum sitrat) / %50 DMSO kullanıldı. “CapitalBio PersonalArrayer™16 (Pekin, Çin)” mikroarray yazıcı kullanılarak özel tasarlanmış mikroarray lamı (CapitalBio OPAMinoSlide™ ; Pekin, Çin) üzerine basılma işlemi gerçekleştirildi. Basımı yapılan mikroarray lamaları, “CapitalBio LuxScan™10K (Pekin, Çin)” Mikroarray Tarayıcı kullanılarak tarama işlemi gerçekleştirildi.

3.1.9. Mikroarray Lamına Basılan Spotların Kontrolü

Deneme amaçlı üretimi yapılan mikroarray lamaları mikroarray tarayıcıda taranarak görüntüleri .jpeg dosyası olarak kaydedildi. DNA konsantrasyonuna bağlı olarak, kullanılan spotlama tamponunun miktarlarında korelasyon olduğu belirlendi. Spotlar genel görünüm, boyut ve şekil açısından değerlendirildi. Mikroarray lamalarının basılma işlemi sonrasında +80°C de bekletilmesinin ardından uygun konsantrasyonlarda SDS (sodyum dodesil sülfat) çözeltisinden geçirilip eş zamanlı olarak alkol ve distile sudan geçirilip kurutuldu. Bu işlem sonrasında CapitalBio LuxScan™10K (Pekin, Çin) cihazında tekrar tarama gerçekleştirilip görüntü kaydedildi. Yıkama işlemi sonrasında spotların bulunduğu bölgeler, siyah halka şeklinde gözlemlendi. Mikroarray tarayıcıdan elde edilen spot görüntülerinin sadece baskılama tamponuna ait olup olmadığını gözlemlenmek amacıyla DNA varlığını belirlemeye yönelik çalışmalar yapıldı.

3.1.10. Mikroarray Lamında Çift İplikli DNA (dsDNA) Kontrolü

Mikroarray lamında, BAC / PAC klonlarına ait çift iplikli plazmid DNA sınıfının varlığını gözlemleyebilmek amacıyla “Quant-IT™ PicoGreen® dsDNA kiti” (Invitrogen, Oregon, USA) içerisinde yer alan PicoGreen ajanı konsantre DMSO’nun 200 kat sulandırılmasıyla 30 µl hacimde hazırlanıp, mikroarray lamına uygulandı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyon süresi sonunda distile sudan geçirilip kurutuldu ve mikroarray tarayıcıda taratıldı.

3.1.11. Mikroarray Lamındaki DNA nın Denatürasyon Kontrolü

Çift iplikli plazmid DNA sının varlığını doğrulamak amacıyla mikroarray lamı kaynamış distile suda 2 dakika bekletilerek lam üzerindeki DNA ların denatürasyonu sağlandı. Quant-IT™ OliGreen® ssDNA kiti (Invitrogen, Oregon, USA) içerisinde yer alan OliGreen ajanı, PicoGreen yönteminde kullanılan aynı protokolle konsantre DMSO'nun 200 kat sulandırılmasıyla 30 µl hacimde hazırlanıp, mikroarray lamına uygulandı (Reyderman ve Stavchansky, 1996; Gray ve Wickstrom, 1997). Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyon süresi sonunda distile sudan geçirilip kurutuldu ve mikroarray tarayıcıda taratıldı.

3.1.12. Hedef DNA ların Mikroarray Lamına Basılması

Spektrofotometrik ve florometrik yöntemlerle miktar tayinleri yapılan BAC / PAC klonlarına ait DNA örnekleri, eşit konsantrasyonda olacak şekilde hesaplamaları yapılarak 384 kuyucuklu mikroplağa aktarıldı. DNA örneklerine 1000 ng/ml konsantrasyonda olacak şekilde CapitalBio DNA Spotting Buffer (Pekin, Çin) ile sulandırım yapıldı. CapitalBio PersonalArrayer™16 (Pekin, Çin) mikroarray yazıcı ile özel tasarlanmış mikroarray lamı (CapitalBio OPAmينوSlide™ (Pekin, Çin)) üzerine basılma işlemi gerçekleştirildi. Basılma işlemi sonrasında mikroarray lamları 80°C de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda % 0,1 (w/v) SDS de 5 dakika, % 0,2 (w/v) SDS de 5 dakika çalkalandı. Oda sıcaklığındaki % 70 (v/v), %80 (v/v) ve % 100 (v/v) alkol serisinden 2 şer dakika geçirilerek dehidrasyon sağlandı. Lamalar kuruduktan sonra CGH çalışmasında kullanılmak üzere desikatöre kaldırıldı.

3.2. POY TANISINA YÖNELİK GELİŞTİRİLEN MİKRODİZİN BAZLI KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYON KİTİ KULLANILARAK MİKROARRAY CGH ÇALIŞMA PROTOKOLÜNÜN OPTİMİZASYONU

3.2.1. Referans DNA Örneklerinin Restriksiyon Enzimiyle Kesimi

Referans erkek ve kadın DNA sı için ticari olarak satılan “Human Genomic DNA: Male (224 µg/ml)” ve “Human Genomic DNA: Female (261 µg/ml)” (Promega, Madison, USA) kullanıldı. Ticari olarak elde edilen referans DNA örneklerine, işaretleme protokolünden önce DNA fragmentasyonu için enzim kesimi uygulandı. Bu amaçla, 3 µg/µl DNA örneklerinin kesimi için *HindIII* Restriksiyon Enzimi (Promega, Madison, USA) kullanıldı. Kit'in önerdiği yönteme göre (Old ve diğ., 1975; Hung ve diğ., 1991), 3 µg/µl DNA kesimi için steril

mikrosantrifüj tüpüne son hacim 60 µl olacak şekilde sırasıyla; DNA miktarıyla birlikte 51,9 µl ye tamamlanacak şekilde steril dH₂O, 6 µl RE 10X Tampon, 0,6 µl Asetillenmiş BSA (Bovine Serum Albumine) (10 µg / µl), 3 µg / µl DNA eklenip pipetajla karıştırıldı ve 1,5 µl Restriksiyon Enzimi (10 u / µl) buz üzerinde eklendi (Tablo 3.9). 60 µl son hacimdeki karışıma pipetaj yapılarak kısa süreli santrifüj edildi. 37°C de 4 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında DNA fragmentasyonunun kontrolü için 5 µl kesime uğratılmış DNA örneği 2 µl 6X yükleme tamponuyla karıştırılıp %1 (w/v) lik agaroz jel elektroforez sisteminde 120 V da yürütüldü.

Tablo 3.9: *Hind*III Restriksiyon Enzimiyle DNA kesim reaksiyonu.

Reaksiyon bileşenleri (1 µg/ µl DNA için)	Miktar (20 µl)
Steril distile su	16,3 µl
RE 10X Tamponu	2 µl
Asetillenmiş BSA, 10 µg / µl	0,2 µl
DNA, 1 µg / µl	1 µl
Restriksiyon Enzimi, 10 u / µl	0,5 µl

3.2.2. DNA Örneklerinin Saflaştırılması

Restriksiyon enzimiyle kesime uğratılan DNA örneklerinin saflaştırılması “DNA Clean & Concentrator-5TM” (Zymo Research, USA) kitiyle yapıldı (www.zymoresearch.com). Kit prosedürüne göre, 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüplerinde kesime uğratılmış DNA örneklerinin 2 kat hacminde DNA Bağlama Tamponu (DNA Binding Buffer) eklendi ve vorteks yapılarak karıştırıldı. Karışım, kittede yer alan “Zymo-SpinTM” içeren toplama tüpüne (Collection Tube) aktarıldı. 10,000 rpm de 30 saniye santrifüj edildi ve tüpte toplanan sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 200 µl Yıkama Tamponu (Wash Buffer) eklenerek 10,000 rpm de 30 saniye santrifüj edildi ve yıkama aşaması tekrarlandı. Kolon yeni bir 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. 10 µl steril distile su eklenerek 10,000 rpm de 30 saniye santrifüj edildi. Aynı işlem tekrar edilerek 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüpünde DNA örneklerinin elüsyonu sağlandı. Saflaştırılan DNA örneklerinin konsantrasyonu, bölüm 3.1.7.2. de belirtilen prosedüre uygun olarak PicoGreen

yöntemiyle florometrik olarak belirlendi ve Mikroarray Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (aCGH) çalışmasında kullanılmak üzere konsantrasyon eşitlemesi yapıldı.

3.2.3. Kesime Uğratılmış Referans DNA ların Farklı Renkteki Florokromlarla İşaretlenmesi

Karşı cinsiyetlere ait referans DNA ları “BioPrime[®] DNA Labeling System (Invitrogen, Carlsbad, CA)” işaretleme kiti kullanılarak, cyanine-3dUTP (Cyanine 3) ve cyanine-5dUTP (Cyanine 5) ile ayrı ayrı işaretlendi (Feinberg ve Vogelstein, 1983; 1984). 200 µl lik PCR tüpüne 0,15-2,0 µg genomik DNA eklendikten sonra total hacim steril distile su ile 25 µl ye tamamlandı. 20 µl 2.5X Random Primer / Reaksiyon Tamponu eklendi. Reaksiyon karışımı 99°C de 10 dakika denatürasyona bırakıldı ve süre sonunda 5 dakika buz üzerinde bekletildi. Kısa süreli santrifüj yapıp, tekrar buz üzerine alındı. Örnekler buz üzerindeyken, 5 µl cyanine işaretli nukleotid karışımı (erkek referans DNA örneği için Cy3-dUTP, kadın referans DNA örneği için Cy5-dUTP (Enzo Life Science, 1 mM stok) ve 1 µl Klenow Fragment eklendi (Tablo 3.10). Tüpteki içerik karıştıktan sonra kısa süreli santrifüj edildi. Reaksiyon karışımı 37°C de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüpler buz üzerine alındı ve işaretleme reaksiyonunun verimliliğini kontrol etmek için %1 (w/v) lik agaroz jelde yürütmek üzere mikrosantrifüj tüplerine 5 µl örnek ayrıldı. Geriye kalan reaksiyon karışımına 5 µl Reaksiyon durdurma tamponu (Stop Buffer) eklendi ve kısa süreli santrifüj edildi. 72°C de 10 dakika inkübe edilerek enzim inaktivasyonu sağlandı ve 4°C ye soğutularak kısa süreli santrifüj edildi.

Tablo 3.10: "BioPrime® DNA Labeling System" ile işaretleme reaksiyonu.

Reaksiyon bileşenleri (0,15 - 2 µg / µl DNA için)	İçerik
2.5X Random Primer / Reaksiyon Tamponu	125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 12.5 mM MgCl ₂ , 25 mM 2-merkaptoetanol, 750 µg / ml oligodeoksiribonukleotid primerler (random oktamerler).
Klenow Fragmenti (DNA Polimeraz I Büyük Fragmenti)	50 mM potasyum fosfat (pH 7.0) içerisinde 40 U / µl Klenow Fragmenti, 100 mM KCl, 1 mM DTT, %50 (v/v) gliserol.
Durdurma Tamponu	0.5 M Na ₂ EDTA (pH 8.0)

3.2.4. İşaretlenmiş DNA ların Çöktürülmesi

Referans tüplerindeki örnekler, farklı renkte işaretli olan kendi test tüplerine eklendi. Karışıma, Cot-1 DNA ve Salmon sperm DNA içeren 45 µl Hibridizasyon Tamponu I eklendi. Her bir tüpe 12,9 µl, 5 M NaCl ve 130 µl oda sıcaklığındaki izopropanol eklendi, parmakla vurularak içeriğin karışması sağlandı ve mikrosantrifüjde spin edildi. Tüpler 20 dakika dik şekilde ışıktan korunarak muhafaza edildi. 14500 rpm de 4°C de 20 dakika santrifüj edildi. Mor pellet oluştuğundan emin olunarak, süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. 500 µl % 70 lik etanol eklendi ve 13200 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Etanol pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve ışıktan korumalı bir şekilde tüpün ağzı açık vaziyette 20 dakika bekletildi. Pelletteki DNA ya, 5 µl nukleaz içermeyen steril distile su (aCGH suyu) eklendi. 37°C de 15 dakika inkübasyona bırakılarak pellet üzerinde ayrı bir tabaka oluşturan aCGH suyunun DNA ile süspanse olması sağlandı.

3.2.5. İşaretlenmiş DNA'nın Mikroarray Üzerinde Hibridizasyonu

Formamid, 20X SSC, %1 (w/v) SDS ve diğer bileşenleri içeren Hibridizasyon Tamponu II, 50°C de tamamen çözündürülerek içeriğin iyice karışması sağlandı ve 4000 rpm de 15 saniye santrifüj edildi. Her tüpe 11,6 µl Hibridizasyon Tamponu II ve 5 µl işaretlenmiş DNA örneği eklendi, içeriğin karışması sağlandı ve kısa süreli santrifüj edildi. Hibridizasyon reaksiyon karışımı 72°C de 10 dakika denatüre edildi ve süre sonunda buz üzerine alınarak 5 dakika bekletildi. Örnekler 37°C de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu süre tamamlanmadan mikroarray lamaları kaynamış distile suda 2 dakika denatüre edildi. % 70 (v/v) (soğuk), % 80 (v/v), % 100 (v/v) alkol serisinden geçirilerek son fiksasyon yapıldı ve kurutuldu. Hibridizasyon kasetinin içine filtre kağıdı konuldu, hibridizasyon süresince nemli bir ortam sağlamak amacıyla 150 µl distile su ile ıslatıldı. Array lamı, barkod kısmı yukarıya bakacak şekilde kasete yerleştirildi ve üzerine 16,6 µl lik hibridizasyon karışımı damlatılıp lamelle kapatıldı. Hibridizasyon kaseti kapatılarak alüminyum folyo ile kaplanmış şekilde hava geçirmeyen, nemli bir kutu içinde 37°C de 16 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.6. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Protokolü

Lamlar yıkama kabında tamamen sıvıyla kaplanacak şekilde yıkama kaplarına lam başına 50 ml Yıkama Tamponu 1, Yıkama Tamponu 2, Yıkama Tamponu 3, Yıkama Tamponu 4 eklendi ve Yıkama Tamponu 1 hariç diğerleri ön ısıtma yapılarak 50°C ye getirildi. Yıkama tamponlarının içerikleri Tablo 3.11 de verildi. Dikey bir yıkama kabında, oda sıcaklığında Yıkama Tamponu 1 içinde lamel uzaklaştırıldı. Lamlar, 50°C de 20 dakika Yıkama Tamponu 2 ile çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 50°C de 20 dakika Yıkama Tamponu 3 ile çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Farklı bir yıkama kabında 50°C de 10 dakika Yıkama Tamponu 4 ile tekrarlanarak yıkama işlemi sonlandırıldı. Lamlar 10 saniyeden fazla olmamak koşuluyla distile sudan geçirildi. Mikroarray santrifüj tüplerine yerleştirilen lamlar, 1700-2000 rpm ye kadar kısa süreli santrifüj edilerek lamların kuruması sağlandı.

Tablo 3.11: Hibridizasyon sonrası yıkama aşamasında kullanılan solüsyonlar.

Yıkama Tamponları	Tampon içeriği (50 ml)
Yıkama Tamponu 1	2X SSC, % 0,5 (w/v) SDS
Yıkama Tamponu 2	2X SSC, % 50 (v/v) deiyonize formamid
Yıkama Tamponu 3	2X SSC, % 0,1 (v/v) NP-40
Yıkama Tamponu 4	0,2X SSC

3.2.7. Tarayıcı ve Yazılım Kullanılarak Mikroarray Lamalarının Taranması ve Analizi

Hibridizasyon sonrası yıkaması yapıp kurutulan mikroarray lamaları, LuxScan™ 10K (CapitalBio) mikroarray tarayıcıya yerleştirilip tek filtrede ön tarama gerçekleştirildi (pre-scan aşaması). Kapalı olan filtre açık konuma getirilerek kırmızı (635 nm) ve yeşil (532 nm) filtrelerde tarama (scan) yapıldı ve görüntü .tiff dosyası olarak kaydedildi. “Personal Arrayer™ 16 Mikroarray Yazıcı” da oluşturulan mikroarray lamına basılan spotlara ait veriyi içeren .xls dosyası “LuxScan™ 10K” cihazına yüklendi. Üretici firma tarafından sağlanan yazılım programı kullanılarak hibridizasyon görüntüsü ile array üzerindeki spotlara ait veri birleştirildi. Her spota ait kırmızı ve yeşil floresan sinyal oranı hesaplandı ve floresan oranlarına göre yorum yapıldı.

3.3. POY TANISI ALMIŞ HASTA ÖRNEĞİNİN GELİŞTİRİLEN MİKROARRAY KİTİNDE UYGULANMASI

3.3.1. Test (hasta ya da kontrol) Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

Hasta olur onayı alınmış POY tanılı hastadan EDTA’lı tüpe alınan kan örneğinden Qiagen, “Gentra Puregene Blood Kit” ile izolasyonu yapılan DNA örneği, kit içerisinde yer alan DNA Hidrasyon solüsyonu içerisinde 2 µg/29,7µl konsantrasyonda “iGenomix, İspanya” Laboratuvarından temin edildi. E.M.P. adlı 33 yaşındaki hastanın 18 yaşında adetten kesilmiş olması ve yüksek FSH değeri (96.4 IU/ml.) kriterleriyle çalışmaya dahil edilmesine karar verildi. Soy geçmişinde POY tanısı almış yada otoimmün hastalığa sahip birey bulunmayan hastanın annesinin *Ataxia cerebellosa* nedeniyle ölmüş olduğu not edildi. Kontrol olur onayı alınmış sağlıklı bireylerden EDTA’lı tüpe alınan kan örneklerinden AbsoGene, Kandan

Genomik DNA İzolasyon Kiti'nde önerilen yönteme göre genomik DNA izolasyonu yapıldı. Kit protokolüne göre 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne 20 µl Proteinaz K (5 mg/ml) eklendi. Üzerine 250 µl kan örneği ve hemen ardından 250 µl B Solüsyonu eklenerek 20 kere tekrarlı vorteks yapıldı. Kısa süreli santrifüj edildi ve her 3 dakikada bir karıştırılmak suretiyle 65°C de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 200 µl % 96-100 (v/v) etanol eklenip vorteksle 20 kez karıştırıldı. Kısa süreli santrifüj edildikten sonra karışım, kit içerisinde yer alan kolonlu tüpe aktarıldı. 8.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Sıvıyı toplayan tüp atılarak, kolon yeni bir tüpe alındı. 700 µl W1 Solüsyonu eklenip 8.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi ve kolon yeni bir tüpe alındı. 700 µl W2 Solüsyonu eklenip 13.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi ve tüpte toplanan sıvı uzaklaştırılıp kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi. 14.000 rpm de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolon, yeni bir 1,5 ml lik tüpe transfer edildi. Önceden 70°C ye ısıtılmış E Solüsyonundan 200 µl eklenip oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 14.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon uzaklaştırıldı ve mikrosantrifüj tüpü içerisindeki genomik DNA'yı içeren sıvı, array CGH çalışmasında kullanılmak üzere -20°C ye kaldırıldı.

Array CGH çalışmasında kullanılmak üzere Referans DNA olarak ticari satılan Promega, Human Genomic DNA: Male (224 µg/ml) ve Female (261 µg/ml) kullanıldı.

3.3.2. Test ve Referans DNA Örneklerinin Fragmentasyon Optimizasyonu

Mikroarray CGH çalışmasında, farklı renkte işaretlenmiş test ve referans DNA örneklerinin mikroarray üzerindeki hedef DNA ile hibridizasyon etkinliğinin artırılması amacıyla DNA fragmentasyonu için Restriksiyon Endonukleaz Kesimi ve Dejenere Oligonukleotid PCR (DOP-PCR) yöntemi uygulandı.

3.3.2.1. Test ve Referans DNA Örneklerinin Restriksiyon Enzimiyle Kesimi

Test (hasta ya da kontrol) ve referans DNA örneklerine, işaretleme protokolünden önce DNA fragmentasyonu için enzim kesimi uygulandı. Bu amaçla, 3 µg/µl DNA örneklerinin kesimi için *HindIII* Restriksiyon Enzimi (Promega, Madison, USA) kullanıldı. Protokol olarak bölüm 3.2.1. temel alındı.

3.3.2.2 Kesime Uğratılmış Test ve Referans DNA Örneklerinin Saflaştırılması

Restriksiyon enzimiyle kesime uğratılan test ve referans DNA örneklerinin saflaştırılması “DNA Clean & Concentrator-5TM” (Zymo Research, USA) kitiyle yapıldı. Bölüm 3.2.2. de yer alan kit prosedürü uygulandı.

3.3.2.3. Test ve Referans DNA ların Farklı Renkteki Florokromlarla İşaretlenmesi

Test DNA sı ve karşı cinsiyete ait referans DNA sı “BioPrime[®] DNA Labeling System (Invitrogen, Carlsbad, CA)” işaretleme kiti kullanılarak, cyanine-3dUTP (Cyanine 3) ve cyanine-5dUTP (Cyanine 5) ile ayrı ayrı işaretlendi. İşaretleme reaksiyonu için bölüm 3.2.3. de yer alan kit prosedürü uygulandı.

3.3.2.4. Test ve Referans DNA sının Dejenere Oligonukleotid PCR (DOP-PCR)

Yöntemiyle Çoğaltılıp, Farklı Renkteki Florokromlarla İşaretlenmesi

Test ve referans DNA'ların restriksiyon endonukleazı ile kesime uğratılıp, saflaştırma kiti ile temizlenmesi sonucu yapılan florometrik tayinde, başlangıçtaki DNA miktarında büyük kayıp (~1/5-1/6 kat) olduğu ve geriye kalan DNA konsantrasyonunun işaretleme reaksiyonu için uygun olmadığına karar verildi. Bu amaçla restriksiyon kesimi ile DNA fragmentasyonu yerine, az miktarda DNA örneği ile DNA'nın gerekli konsantrasyona kadar çoğaltılabildiği DOP-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Dejenere oligonukleotid-primerli PCR (DOP-PCR) olarak adlandırılan yöntem; dejenere dizilere sahip oligonukleotid primerlerin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çeşididir. PCR protokolüyle birlikte dejenerasyonun kullanılması, düşük bağlanma sıcaklığında primerlerin hedef genomda çok sayıda bölgeye bağlanmasını sağlamaktadır (Telenius ve diğ., 1992). PCR temelli total genom amplifikasyonu çalışmalarındaki amaç, pikogram ya da nanogram miktarındaki başlangıç DNA materyalinden mikrogram düzeyde elde etmektir. Hedef diziye spesifik primer çiftlerinin kullanıldığı geleneksel PCR yönteminden farklı olarak DOP-PCR'da, 3' ve 5' uçları arasında heksamer dizilerin yer aldığı tek primer kullanılır. Farklı türler için aynı primer kullanılarak etkili DNA çoğaltımı gerçekleştirilebilmektedir. DOP-PCR; genel DNA çoğaltılmasında kullanılan yöntemler arasında hızlı, etkili ve tür bağımsız bir tekniktir (Arneson ve diğ., 2008).

Ticari satılan referans erkek ve referans kadın DNA sının (Promega, Madison, USA) birlikte kullanılacağı ve İspanya'dan temin edilen amenore (adetten kesilme) yaşı 18 olan 33 yaşındaki POY hastasına ait DNA örneği ile bu örnekle hibridizasyona girecek olan referans kadın DNA sı için iki ayrı DOP-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. DNA örneklerinin çoğaltımı için; 50 µl son hacimde 1 µg DNA örneği, 1 µl DOP-PCR primeri (5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3') (2.0 µmol/l, Sentromer), 1 µl *Taq* DNA Polimeraz (5 U/µl, Fermentas), 4 µl dNTP karışımı (2,5 mM/ml, DSBIO), 5 µl PCR Tamponu (10X *Taq* Buffer, KCl, Fermentas) ve 6 µl MgCl₂ (25 mM, Fermentas) eklenerek reaksiyon karışımı steril dH₂O ile 50 µl ye tamamlandı. Tablo 3.12. de yer alan koşullarda SensQuest marka PCR cihazında DOP-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi (Hu ve diğ., 2004).

Tablo 3.12: DOP-PCR ile DNA çoğaltımında kullanılan PCR programı.

*: 72°C de uzatma aşamasında her siklusda 3 dakikaya 10 saniye eklendi.

Program türü	Derece (°C)	Süre (dk)	Siklus
Denatürasyon	95	4	
Bağlanma-Uzatma	94	1	25
	62	1	25
	72	3 *	25
Son uzatma	72	10	
Sonlandırma	4	∞	

Reaksiyon sonunda 5 er µl DOP-PCR ürünü % 1 (w/v) lik agaroz jelde yürütülerek reaksiyon kontrolü yapıldı. DNA konsantrasyonu, bölüm 3.1.7.2. de yer alan florometrik tayinle belirlendikten sonra DNA miktarları eşitlendi ve bölüm 3.2.3. de yer alan Cyanine-3dUTP (Cyanine 3) ve Cyanine-5dUTP (Cyanine 5) ile işaretleme reaksiyonu uygulandı.

3.3.3. İşaretlenmiş DNA ların Çöktürülmesi

Referans tüplerindeki örnekler, farklı renkte işaretli olan kendi test tüplerine eklendi. Çöktürme işlemi için bölüm 3.2.4 de yer alan prosedür uygulandı. Pelletteki DNA'ya, 5 µl nukleaz içermeyen steril distile su (aCGH suyu) eklendi. 37°C de 15 dakika inkübasyona

bırakılarak pellet üzerinde ayrı bir tabaka oluşturan aCGH suyunun DNA ile süspansiyonu sağlandı.

3.3.4. İşaretlenmiş DNA'nın Mikroarray Üzerinde Hibridizasyonu

Hibridizasyon protokolü için bölüm 3.2.5. temel alındı. İşaretlenmiş DNA örneğine, bölüm 3.2.5. de belirtilen şekilde Hibridizasyon Tamponu II eklenerek, hibridizasyon reaksiyon karışımı 72°C de 10 dakika denatüre edildi ve süre sonunda buz üzerine alınarak 5 dakika bekletildi. Örnekler 37°C de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu süre içinde mikroarray lamalarının denatürasyonu yapıldı, alkol serisinden geçirildi ve kurumaya bırakıldı. Array lamı hibridizasyon kasetine yerleştirildi, 12 µl lik her karışım, lamel üzerindeki örnek yükleme kuyucuğundan array lamına uygulandı. Hibridizasyon kaseti kapatıldı. Hibridizasyon kaseti alüminyum folyo ile kaplanarak hava geçirmeyen, nemli bir kutu içinde 37°C de 16 saat inkübasyona bırakıldı.

3.3.5. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Protokolü

Lamlar yıkama kabında tamamen sıvıyla kaplanacak şekilde lam başına 50 ml Yıkama Tamponu 1, Yıkama Tamponu 2, Yıkama Tamponu 3, Yıkama Tamponu 4 yıkama kaplarına eklendi ve ön ısıtma yapılarak 50°C ye getirildi. Bölüm 3.2.6. da yer alan yıkama protokolü uygulanıp 1700 rpm ye kadar kısa süreli santrifüj edilerek mikroarray lamalarının kuruması sağlandı.

3.3.6. Tarayıcı ve Yazılım Kullanılarak Mikroarray Lamalarının Taranması ve Analizi

Hibridizasyon sonrası yıkaması yapıldı kurutulan mikroarray lamalarının taranması ve analizi için bölüm 3.2.7. temel alındı.

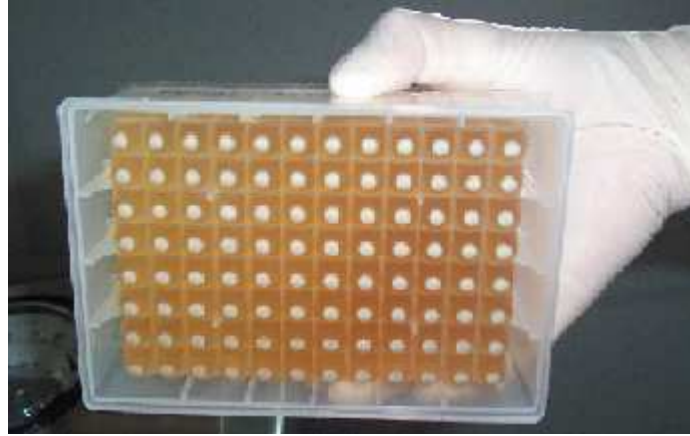
4. BULGULAR

4.1. POY TANISINA YÖNELİK MİKRODİZİN BAZLI KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYON KİTİ TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ

POY ile ilişkili olduğu belirtilen gen ve gen dışı bölgelere ait klonların toplamı olan 413 BAC / PAC klonu, 5 adet 96 kuyucuklu mikroplakta çalışıldı. 5 mikroplağın tümüne uygulanacak yöntemlerin optimizasyonu için rastgele seçilen 61 BAC / PAC klon ile oluşturulan mikroplak kullanıldı.

4.1.1. BAC / PAC Klonlarının Üretilmesi

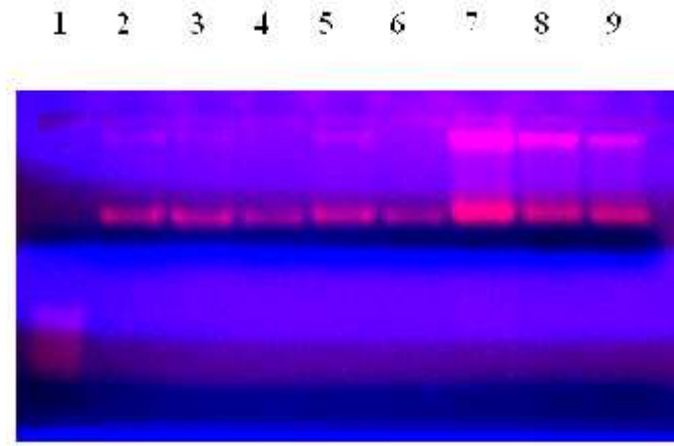
Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde 3.1.2. BAC / PAC Klonlarının Kopyalanması ve 3.1.3. Hücrelerin Zengin Besiyeri Ortamına Alınması kısmında belirtilen yöntemle göre steril koşullar altında seçici kültür ortamında çoğaltılan BAC / PAC klonlarına ait pelletler, 3600 rpm de +4°C de 20 dakika santrifüj edilerek elde edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Kültür ortamında üretilen BAC / PAC klonlarına ait pelletlerin santrifügasyonla eldesi.

4.1.2. BAC / PAC Klonlarından Plazmit DNA İzolasyonu

Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde 3.1.4. kısmında belirtilen yönteme göre rastgele seçilmiş 61 klondan izolasyonu yapılan plazmid DNA ları %1 (w/v) lik agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. Plazmid DNA larına ait bantlar ultraviyole (UV) ışık altında parlak ve net çift bant halinde gözlemlendi (Şekil 4.2).

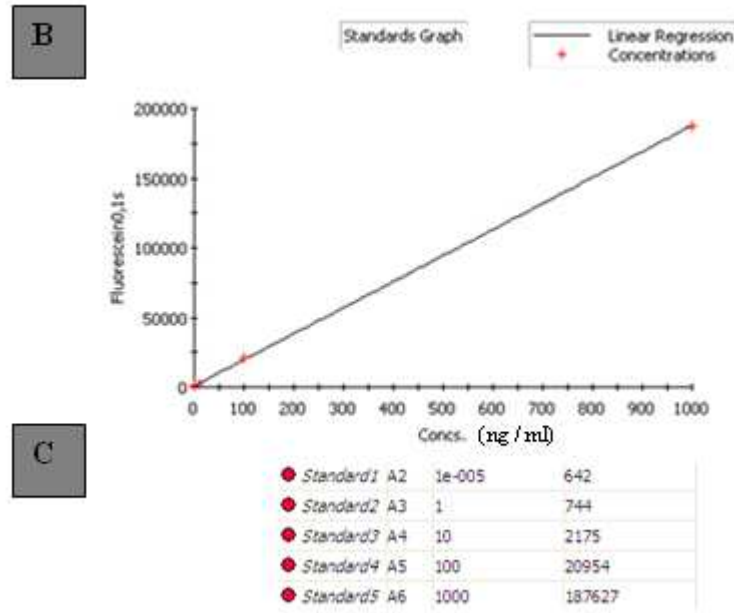


Şekil 4.2: BAC / PAC klonlarına ait plazmit DNA larının %1 (w/v) lik agaroz jeldeki görünüşleri.

(1. cep: 100 bç lik standart markır, 2- 9. cepler: rastgele seçilmiş plazmid DNA ları).

4.1.3. BAC / PAC Plazmit DNA sının Çoğaltılması

DNA izolasyonu yapılan BAC / PAC klonlarına, Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde 3.1.6. kısmında belirtilen yönteme göre Total Genom Amplifikasyonu yapıldı. Pozitif kontrol için kit içerisinde yer alan 10 ng/ μ l konsantrasyondaki lambda DNA'sı (λ DNA'sı), negatif kontrol olarak da steril distile su kullanıldı. Reaksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü, %1 (w/v) lik agaroz jel elektroforezi yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.4: Picogreen yöntemiyle DNA konsantrasyonunun belirlenmesi.

- A) 1→61: A1 den F1 e kadar; 413 POY'a ait BAC / PAC klonundan rastgele seçilmiş 61 adet çoğaltılan BAC / PAC DNA örneği ,
62: Çoğaltılan Pozitif kontrol DNA sı, 63: Negatif kontrol. B) Standart eğri (1-1000 ng/ml DNA). C) Standart eğri
hazırlanmasında kullanılan DNA'lara ait florometrik değerler.

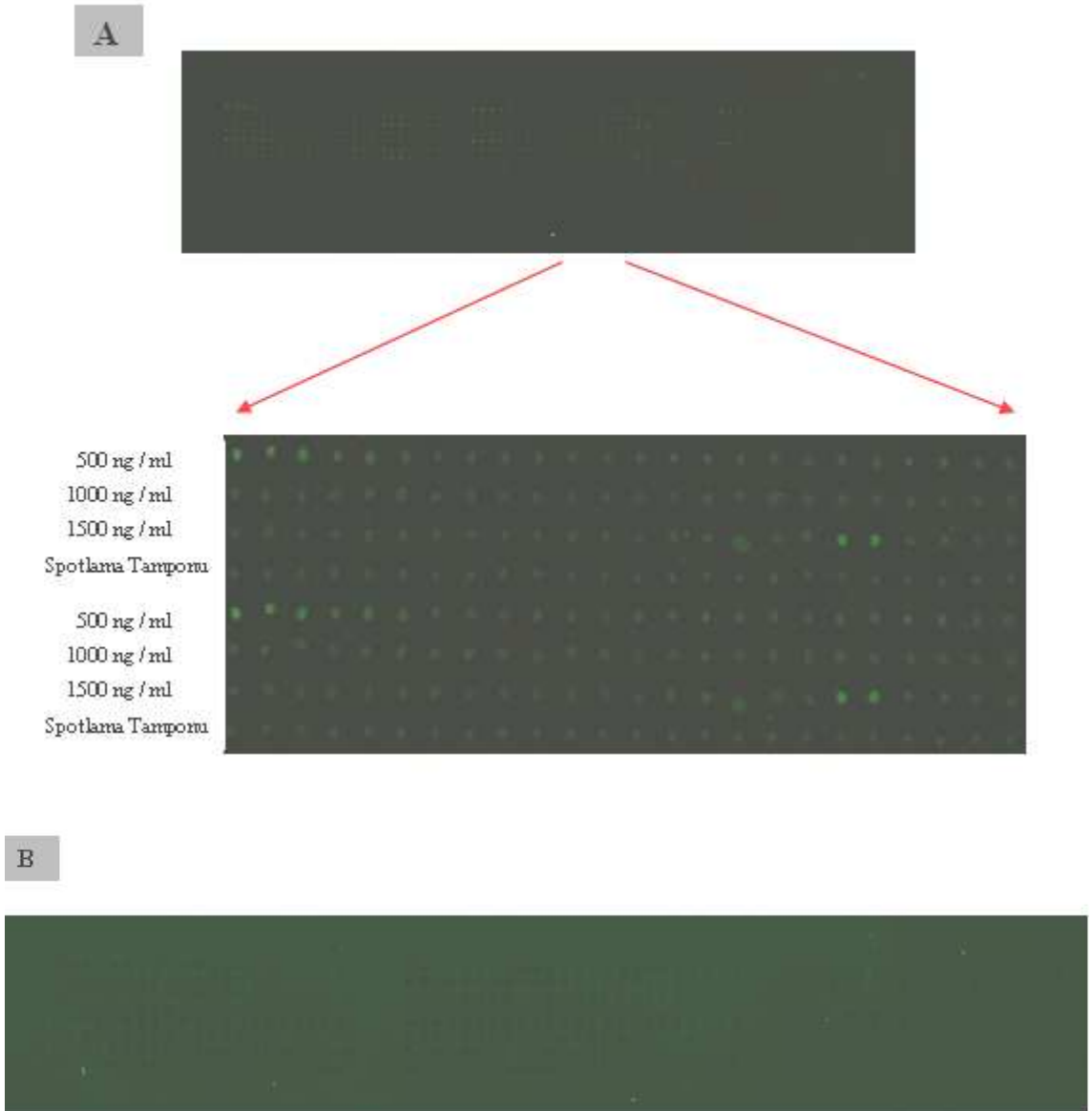
4.1.5. Mikroarray Basımı İçin DNA Konsantrasyonu Optimizasyon Sonuçları

Mikroarray baskılamasında (spotlama) kullanılacak olan DNA örneklerinin optimum konsantrasyonunun ve optimum baskılama (spotlama) tamponunun belirlenmesi için, farklı konsantrasyonlardaki DNA örnekleri farklı spotlama tamponları ile karıştırılıp, mikroarray lamı üzerine basılma işlemi gerçekleştirildi.

4.1.5.1. DNA Konsantrasyonu ve Spotlama Tamponu Optimizasyonu Sonuçları

Eşit konsantrasyona getirilmiş DNA örnekleri Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde 3.1.8. kısmında belirtilen şekilde, farklı spotlama tamponları ("CapitalBio DNA Spotting Buffer (Pekin, Çin)", "%50 DMSO (dimetilsülfoksit)", "3XSSC (sodyum klorür-sodyum sitrat) / %50 DMSO") içinde bulunan farklı DNA konsantrasyonları (500 ng/ml, 1000 ng/ml, 1500 ng/ml) mikroarray lamına basıldı. Deneme amaçlı üretimi yapılan mikroarray lamaları mikroarray tarayıcıda taranarak görüntüleri kaydedildi (Şekil 4.5.A). Mikroarray tarayıcıda

şekil, boyut, homojen dağılım bakımından değerlendirilen spotlar için optimum spotlama tamponunun “CapitalBio DNA Spotting Buffer (Pekin, Çin)” olduğuna karar verildi. Malzeme ve Yöntem Bölümü’nde 3.1.9. kısmında belirtilen yönteme göre yıkaması yapılan mikroarray lamında, yıkama sonrasında spotların bulunduğu bölgeler siyah halka şeklinde gözlemlendi (Şekil 4.5.B).



Şekil 4.5: Mikroarray lamlarının mikroarray tarayıcıda taranan görüntüleri.

A. Basım sonrası taranan mikroarray lamı (1. sıra: 500 ng/ml DNA, 2. sıra: 1000 ng/ml DNA, 3. sıra: 1500 ng/ml DNA, 4. sıra: spotlama tamponu). B. Yıkama işlemi sonrası gözlenen siyah halkalar.

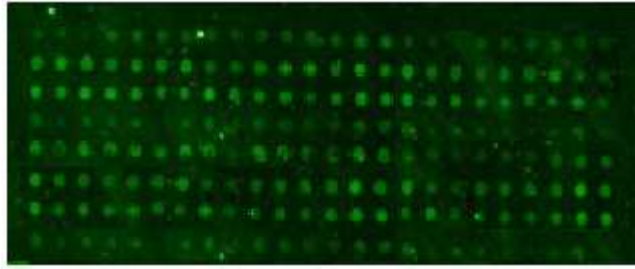
4.1.5.1.1. Mikroarray Lamında Çift İplikli DNA Kontrolü

Mikroarray lamalarının yıkama işlemi sonrasında, spotların bulunduğu bölgelerde siyah halkaların oluşması üzerine DNA varlığını belirlemeye yönelik çalışmalar yapıldı. Mikroarray lamında BAC / PAC klonlarına ait çift iplikli plazmid DNA sının varlığı, Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde 3.1.10 ve 3.1.11. kısımlarında belirtilen şekilde picogreen ve oligreen yöntemiyle belirlendi. PicoGreen uygulaması sonrasında, yeşil filtrede yapılan tarama sonrasında siyah halkaların olduğu yerlerde çift iplikli DNA yı pikogram düzeyinde belirleme hassasiyetine sahip PicoGreen ajanına ait sinyal gözlemlendi (Şekil 4.6.A). OliGreen uygulaması sonrasında, yeşil filtrede yapılan tarama sonucu siyah halkaların olduğu yerlerde tek iplikli DNA yı pikogram düzeyinde belirleme hassasiyetine sahip OliGreen ajanına ait sinyal gözlemlendi. Bu durum çift iplikli DNA da denatürasyonun gerçekleştiğini doğruladı (Şekil 4.6.B).

A



B

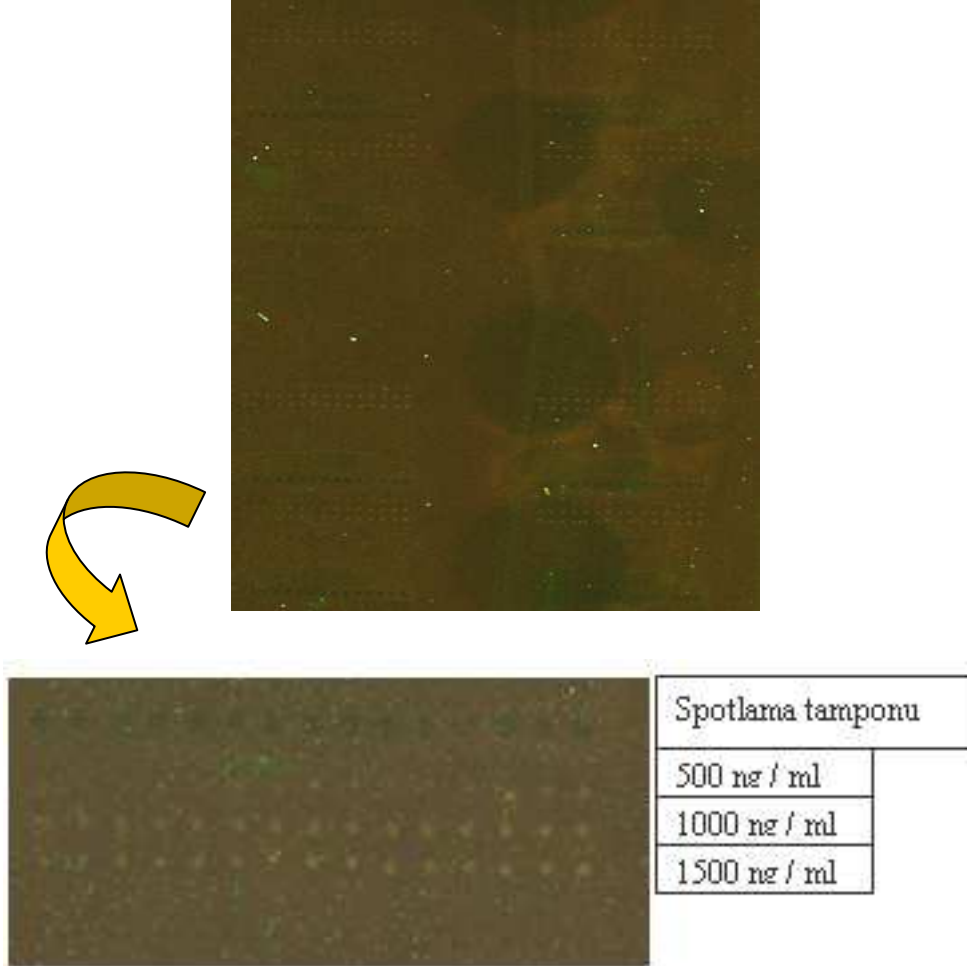


Şekil 4.6: Mikroarray lamında çift iplikli DNA varlığının tespiti.

A. Picogreen yöntemiyle çift iplikli DNA nın tayini. B. Denatürasyona uğratılan DNA nın Oligreen yöntemiyle tayini.

4.1.5.1.2. Mikroarray Lamına Basılacak DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Mikroarray baskılamasında (spotlama) kullanılacak olan DNA örneklerinin optimum konsantrasyonunun belirlenmesi için bölüm 3.1.8. temel alındı. Kontrol (sağlıklı) kadın ve erkek bireylerden EDTA'lı tüpe alınan periferik kan örneklerinden bölüm 3.3.1. de belirtilen şekilde genomik DNA izolasyonu yapıp bölüm 3.2.3. de yer alan kit prosedürüne göre farklı renkte florokromlarla işaretlemesi yapılan DNA örneklerinin melezlenmesi sonucunda; boyut, şekil, hibridizasyon uygunluğu açısından değerlendirilen spot konsantrasyonu için, 1000 ng/ml DNA'nın optimum olduğuna karar verildi (Şekil 4.7.). Bu aşamadan sonra üretimi yapılacak olan mikroarray lamalarının spotlanmasında, tüm BAC / PAC DNA'ları için 1000 ng/ml konsantrasyon kullanıldı.



Şekil 4.7: Cy3 ve Cy5 ile işaretlenmiş sağlıklı kadın ve erkek DNA'sıyla melezleme sonucu optimum DNA konsantrasyonunun belirlenmesi.

1. sıra: Sadece spotlama tamponu içeren spotlarda, DNA olmadığı için melezleme görülmemektedir. 2. sıra: 500 ng/ml; 3. sıra: 1000 ng/ml; 4. sıra: 1500 ng/ml konsantrasyonda basılan DNA örnekleriyle melezleme görüntüsü.

Tablo 4.1: POY'a özgü mikroarray CGH kiti tasarımı ve geliştirilmesinde optimizasyon sonuçları.

Optimizasyon Süreci		Sonuç
Mikroarray baskılamaında (spotlama) kullanılacak optimum DNA konsantrasyonunun belirlenmesi	Yapılan Faaliyetler	Mikroarrayde farklı renklerdeki florokromlarla melezleme sonucunda; boyut, şekil, hibridizasyon uygunluğu açısından değerlendirilen spot konsantrasyonu için, 1000 ng/ml DNA'nun optimum olduğu kararlaştırıldı.
	DNA konsantrasyonunun Florometrik Tayini 500-1000-1500 ng/ml konsantrasyona eşitlenen DNA örneklerinin mikroarray lamına basılması Mikroarray lamalarında floresan ajanlarla hibridizasyon sonrası optimum DNA konsantrasyonunun belirlenmesi DNA örneklerinin farklı konsantrasyonlarda "CapitalBio DNA Spotting Buffer" ile sulandırılarak spotlanması DNA örneklerinin %50 DMSO ile sulandırılarak spotlanması DNA örneklerinin 3XSSC / %50 DMSO ile sulandırılarak spotlanması Spotlama sonrası mikroarray tarayıcıda array lamaların taranması ve spotların şekil, boyut, homojenlik bakımından değerlendirilmesi	
Optimum baskılama (spotlama) tamponunun belirlenmesi		Mikroarray lamalarına basım sonrası mikroarray tarayıcıda değerlendirilen spotlar için optimum spotlama tamponunun "CapitalBio DNA Spotting Buffer" olduğu kararlaştırıldı.
Array CGH yönteminin optimizasyonu		Restriksiyon endonükleaz kesimi sonrasında gerçekleştirilen saflaştırma aşamasında DNA kaybının fazla olması nedeniyle DNA fragmentasyonu için DOP-PCR yönteminin kullanılmasına karar verildi.
		Cy3-dUTP ve Cy5-dUTP Nükleotid karışımı (Enzo, USA) ve "BioPrime® DNA Labeling System (Invitrogen, Carlsbad, CA)" kit bileşenleri kullanılarak 4 saatlik işaretleme reaksiyonu yapılmaya karar verildi.
		Hedef DNA'daki tekrarlı bölgelerin bloke edilmesi ve mikroarrayde hibridizasyonun etkinliği için "Hibridizasyon Tamponu I" ve "Hibridizasyon Tamponu II" geliştirildi.
		Hibridizasyon ugramamış bileşenlerin ortamdaki uzaklaştırılması için "Yıkama Tamponu 1, Yıkama Tamponu 2, Yıkama Tamponu 3 ve Yıkama Tamponu 4" geliştirildi.

4.2. POY TANISINA YÖNELİK MİKRODİZİN BAZLI KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYON KİTİ ÜRETİMİ

POY tanısı için geliştirilen mikroarray CGH kitinin optimizasyon çalışmaları tamamlandı (Tablo 4.1). Optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen tüm veriler, POY'a ait oluşturulan 5 adet (POY 1-5) mikroplak için kullanıldı.

4.2.1. BAC / PAC Klonlarının Kopyalanması

Literatür araştırması sonucu POY ile ilişkili olduğu belirlenen ve sipariş edilen 413 adet BAC / PAC klonu (393 BAC klonu, 20 PAC klonu), Malzeme ve Yöntem Bölümü 3.1.2. ve 3.1.3. kısımlarında belirtilen yöneme göre steril koşullarda çoğaltıldı (Şekil 4.8.).

A



B



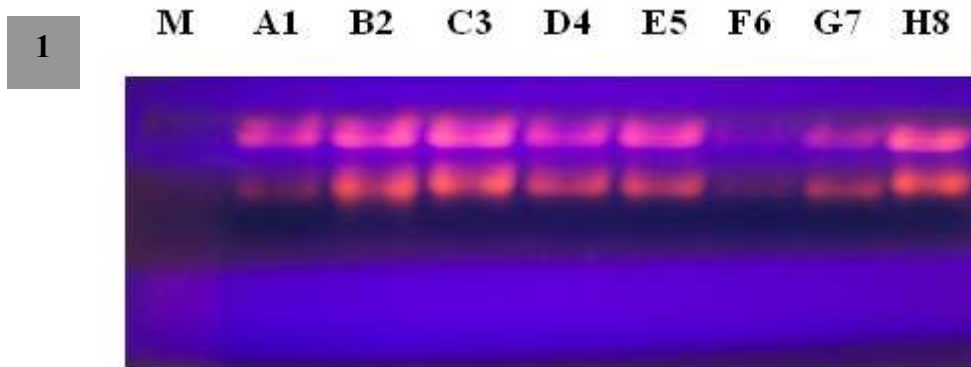


Şekil 4.8: BAC / PAC klonlarının çoğaltılması.

A: BAC / PAC klonlarının ilgili antibiyotiği içeren seçici besiyerlerinde üretilmesi, B: Zengin besiyeri ortamında üretim, C: Zengin besiyerinde üreyen hücrelere ait pelletin santrifügasyon sonucu elde edilmesi.

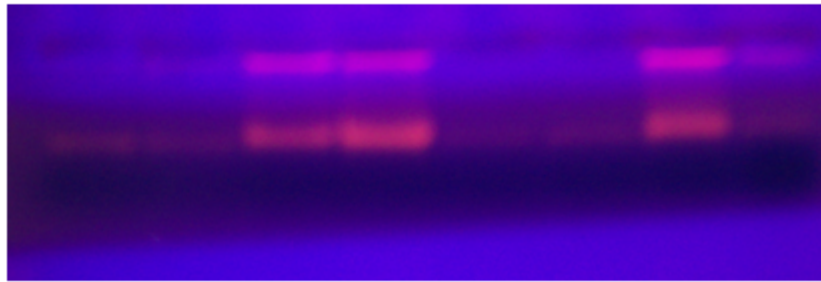
4.2.2. BAC / PAC Klonlarından Plazmit DNA İzolasyonu

5 farklı 96 kuyucuklu mikroplakta (POY 1-5), üretimi gerçekleştirilen 413 adet BAC / PAC klonundan Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde 3.1.4. kısmında belirtilen yönteme göre DNA izolasyonu yapıldı. İzolasyonu yapılan BAC / PAC klonlarına ait plazmid DNA ları %1 lik (w/v) agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. Plazmid DNA larına ait bantlar ultraviyole (UV) ışık altında parlak ve net çift bant halinde gözlemlendi (Şekil 4.9).



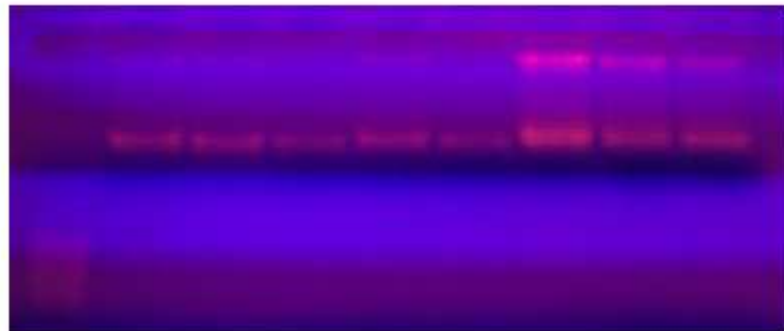
2

A5 B12 C2 D4 E9 F8 G1 H7



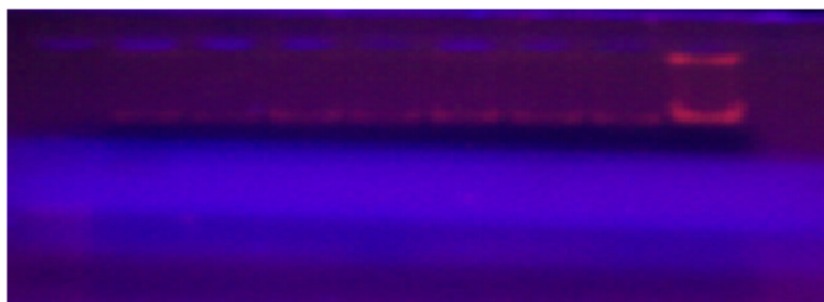
3

M A12 B10 C9 D7 E10 F1 G3 H11

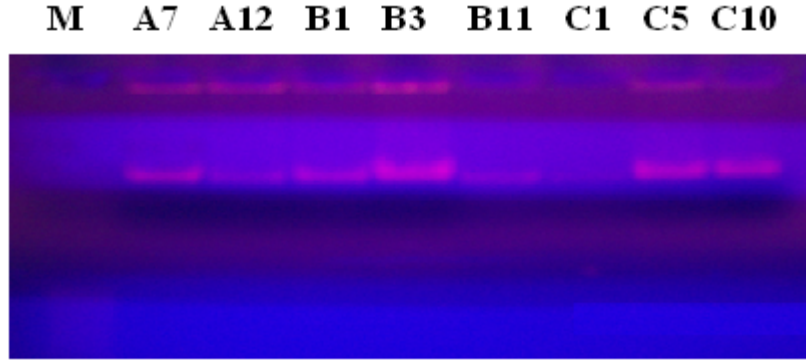


4

M A8 B8 C10 D5 E3 F9 G5 H10



5



Şekil 4.9: BAC / PAC klonlarına ait plazmit DNA larının %1 (w/v) lik agaroz jeldeki görünüşleri.

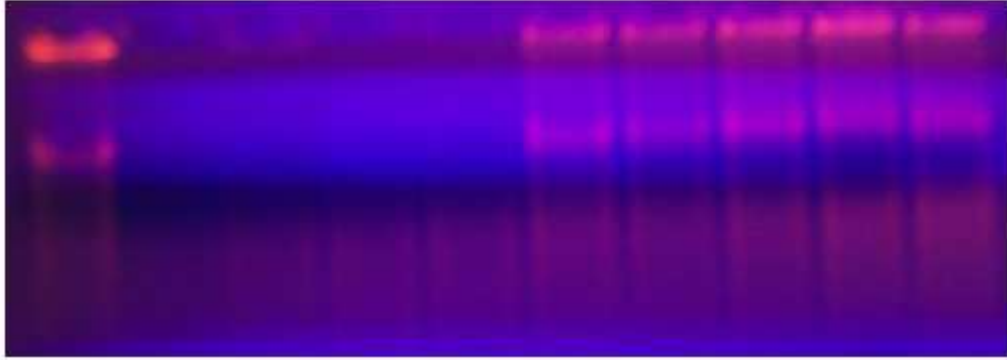
M: 100 bç lik standart markır , 1: POY1 mikroplağında rastgele seçilmiş DNA örnekleri, 2: POY2 mikroplağında rastgele seçilmiş DNA örnekleri, 3: POY3 mikroplağında rastgele seçilmiş DNA örnekleri, 4: POY4 mikroplağında rastgele seçilmiş DNA örneklerinin UV transillüminatörde agaroz jel üzerindeki görüntüleri.

4.2.3. BAC / PAC Plazmit DNA'larının Çoğaltılması

POY1, POY2, POY3, POY4 ve POY5 mikroplaklarında yer alan 413 BAC / PAC klonuna ait DNA örneklerinin çoğaltımı Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde 3.1.6. kısmında belirtilen yönteme göre yapıldı. Pozitif kontrol olarak kit içerisinde yer alan 10 ng/µl lik konsantrasyondaki lambda (λ) DNA s1, negatif kontrol olarak da steril distile su kullanıldı. POY1, POY2, POY3, POY4 mikroplaklarında H1 kuyucuğu (+) kontrol, H12 kuyucuğu da (-) kontrol olarak kullanıldı. Bu kuyulardaki DNA örneklerine ait total genom amplifikasyon reaksiyonu, POY5 mikroplağında sırasıyla D1-D8 kuyularında gerçekleştirildi. Reaksiyonun gerçekleştiğinin kontrolü %1 lik (w/v) agaroz jel elektroforezinde analiz edildi (Şekil 4.10).

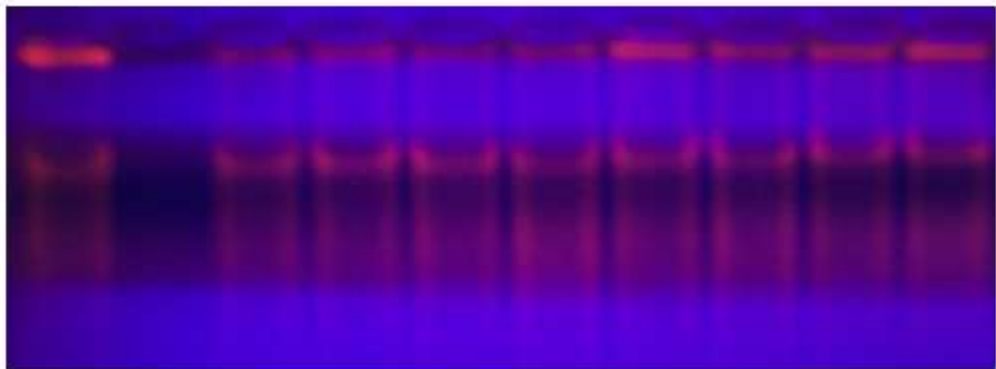
1

(+) (-) A1 B2 C3 D4 E5 F6 G7 H8



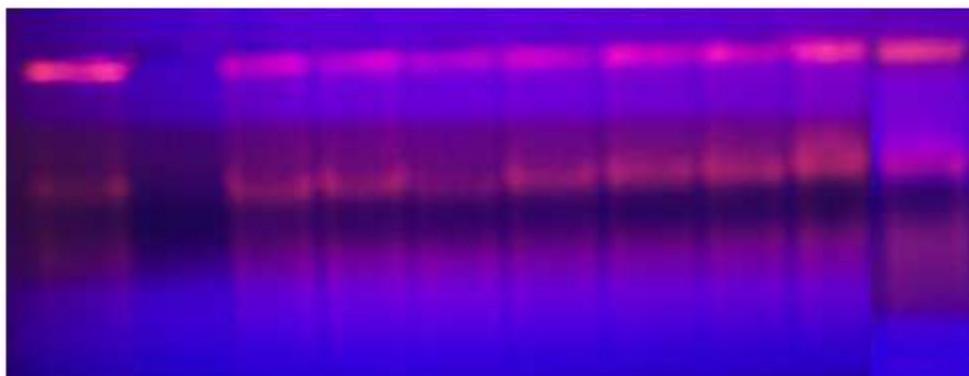
(+) (-) A5 B12 C2 D4 E9 F8 G1 H7

2



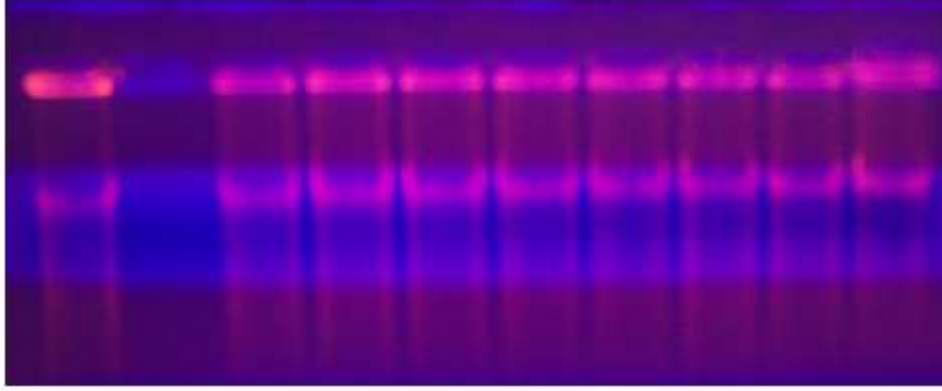
3

(+) (-) A12 B10 C9 D7 E10 F1 G3 H11



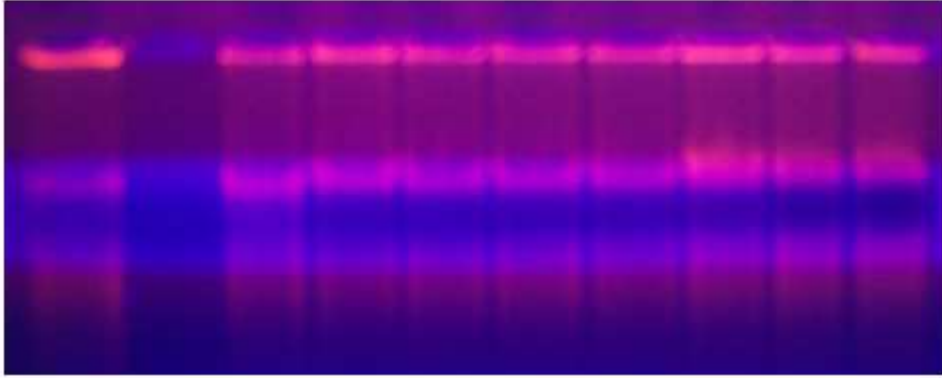
4

(+) (-) A8 B8 C10 D5 E3 F9 G5 H10



5

(+) (-) A7 A12 B1 B3 B11 C1 C5 C10



Şekil 4.10: Çoğaltılan BAC / PAC Plazmit DNA larının %1 (w/v) lik agaroz jeldeki görünüşleri.

(+): Pozitif kontrol, (-): Negatif kontrol, 1-5: POY1, POY2, POY3, POY4 ve POY5 mikroplaklarına ait jelde gözlenmiş aynı DNA örneklerinin çoğaltım sonrası %1 (w/v) lik agaroz jeldeki görünüşleri.

4.2.4. DNA Konsantrasyonunun Florometrik Tayini

Total Genom Amplifikasyonu yapılmış DNA örneklerinin konsantrasyonu, Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde 3.1.7.2. kısmında belirtilen picogreen yöntemine göre belirlendi (Şekil 4.11.).

a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	45468	63693	139737	58287	62805	67880	78740	38354	122255	136345	133180	110825
B	94471	61809	84408	69882	101474	109966	42711	58500	81424	132993	130888	124854
C	72908	53224	76040	85573	132944	62732	138145	128528	52413	88015	42804	129811
D	58018	123761	45379	130285	73878	89202	85209	52274	71151	131730	65172	127960
E	41865	86772	133843	42494	127678	122155	128637	91115	65615	93198	85069	99406
F	67129	82177	129287	97869	126207	130665	127729	132960	128838	52975	86568	90809
G	92943	128257	42924	95731	91284	91044	130004	123774	58379	83374	84931	79140
H	128583	80478	81906	61018	118562	104986	67809	119987	80509	55012	57240	blank

b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	78689	136067	131834	138506	136900	137303	137952	135644	136727	130780	131674	132343
B	123307	114488	132206	138836	139309	134419	123816	116324	84395	133636	114278	126817
C	115635	125158	121498	131103	133453	133275	132312	136991	129857	139181	125443	125415
D	95612	131631	57823	133242	78278	141901	136411	143490	134455	133091	131673	127654
E	114288	77550	100788	61829	130877	142329	123663	136316	136887	125280	130346	128875
F	73517	77620	100969	124880	121718	126164	137068	124658	133401	126332	122008	107403
G	132109	75067	128487	98034	129727	116084	116643	138884	131273	119754	127432	130582
H	134866	87488	80358	117071	125880	131584	127277	115794	138233	124752	73885	blank

c	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	121942	122616	106623	112691	53213	49189	111048	95115	57666	83448	115017	107465
B	88444	86812	105373	91758	121288	61828	63109	111950	104180	116538	104409	109993
C	110708	105046	83190	90832	91238	62067	120003	76821	104212	79847	119856	76654
D	108473	82920	117209	114457	108557	109348	116360	88331	114741	115032	95564	80169
E	83176	89559	117863	94012	107257	112883	76668	105645	115626	110280	81549	85259
F	96498	102303	102139	108093	104426	99743	74087	108789	95614	94073	97044	104255
G	90635	78162	127328	120967	105455	109351	110293	94802	100445	96753	103739	88956
H	104066	97801	99296	90866	96545	109249						blank

d	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	107560	113193	104574	105934	101817	106171	111196	100765	108557	99181	103960	101698
B	93472	101070	101843	101335	99820	93316	102771	109935	93251	101790	103865	92886
C	106803	97117	107366	98436	72264	96598	100589	106542	97234	96409	93640	98213
D	101518	103714	85626	102968	99614	105681	89641	76638	96234	99539	90461	86308
E	97159	101310	95652	101925	98486	95744	95253	83953	92142	97456	90054	101130
F	72090	84642	99450	95623	96454	91669	97216	90586	97418	67326	96268	38970
G	76454	83497	85928	93851	65752	93363	92744	87628	83102	81728	82590	84084
H	92045	79094	85072	71194	83062	89073	75887	59450	73076	84334	79298	blank

e	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	88802	104053	93219	100384	93519	85697	91557	91478	89034	93603	92520	90685
B	92190	93958	82278	94040	89891	87280	90820	84900	90287	86885	79469	79878
C	89146	94831	85652	79139	93034	83062	84404	87100	87709	82916	85560	
D	72136	76253	65123	81864	78600	88982	78486	82973				
E												
F												
G												
H	74662											blank

Şekil 4.11: Total genom amplifikasyonu yapılmış DNA örneklerinin Picogreen yöntemiyle konsantrasyonunun hesaplanması.

a: POY1 wga plak ng/ml DNA konsantrasyonu, b: POY2 wga plak ng/ml DNA konsantrasyonu, c: POY3 wga plak ng/ml DNA konsantrasyonu, d: POY4 wga plak ng/ml DNA konsantrasyonu, e: POY5 wga plak ng/ml DNA konsantrasyonu, kırmızı gösterge: pozitif kontrole ait DNA konsantrasyonu.

4.2.5. DNA Konsantrasyonunun Eşitlenmesi

Mikroarray lamalarına basılma işlemi öncesinde, picogreen yöntemiyle konsantrasyonu belirlenen DNA örnekleri 96 kuyucuklu mikroplaklarda 100 µl hacimde 3000 ng/ml lik stok hazırlandı (Şekil 4.12.). 384 kuyucuklu mikroplakda da 16,6 µl DNA (3000 ng/ml), 33,4 µl spotlama tamponu içinde sulandırılarak 50 µl hacimde 1000 ng/ml ye eşitleme yapıldı (Şekil 4.13.).

a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6,6µl + 93,4	4,7+95,3	2,2+97,8	5,2+94,8	4,8+95,2	4,4+95,6	3,8+96,2	7,8+92,2	2,5+97,5	2,2+97,8	2,3+97,7	2,7+97,3
B	3,2+96,8	4,9+95,1	3,6+96,4	4,3+95,7	3+97	2,7+97,3	7+93	5,2+94,8	3,7+96,3	2,3+97,7	2,3+97,7	2,4+97,6
C	4,1+95,9	5,6+94,4	4+96	3,5+96,5	2,3+97,7	4,8+95,2	2,2+97,8	2,4+97,6	5,7+94,3	3,4+96,6	7+93	2,3+97,7
D	5,2+94,8	2,4+97,6	6,6+93,4	2,3+97,7	4,1+95,9	3,4+96,6	3,5+96,5	5,7+94,3	4,2+95,8	2,8+97,2	4,6+95,4	2,4+97,6
E	7,2+92,8	3,5+96,5	2,3+97,7	7,1+92,9	2,4+97,6	2,5+97,5	2,4+97,6	3,3+96,7	4,6+95,4	3,2+96,8	3,5+96,5	3+97
F	4,5+95,5	3,7+96,3	2,3+97,7	3,1+96,9	2,4+97,6	2,3+97,7	2,4+97,6	2,3+97,7	2,3+97,7	5,7+94,3	3,5+96,5	3,3+96,7
G	3,2+96,8	2,4+97,6	7+93	3,2+96,8	3,3+96,7	3,3+96,7	2,3+97,7	2,4+97,6	5,2+94,8	3,6+96,4	3,5+96,5	3,8+96,8

H	4,2+95,8	3,7+96,3	3,7+96,3	4,9+95,1	2,5+97,5	2,5+97,5	4,4+95,6	2,5+97,5	3,7+96,3	5,5+94,5	5,3+94,7	3,9+96,1
----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,8+96,2	2,2+97,8	2,3+97,7	2,2+97,8	2,2+97,8	2,2+97,8	2,2+97,8	2,2+97,8	2,2+97,8	2,3+97,7	2,3+97,7	2,3+97,7
B	2,5+97,5	2,6+97,4	2,3+97,7	2,2+97,8	2,2+97,8	2,2+97,8	2,4+97,6	2,6+97,4	3,6+96,4	2,3+97,7	2,6+97,4	2,4+97,6
C	2,6+97,4	2,4+97,6	2,5+97,5	2,3+97,7	2,3+97,7	2,3+97,7	2,3+97,7	2,2+97,8	2,3+97,7	2,2+97,8	2,4+97,6	2,4+97,6
D	3,2+96,8	2,3+97,7	5,2+94,8	2,3+97,7	3,9+96,1	2,1+97,9	2,2+97,8	2,1+97,9	2,3+97,7	2,3+97,7	2,3+97,7	2,4+97,6
E	2,6+97,4	3,9+96,1	3+97	4,9+95,1	2,3+97,7	2,1+97,9	2,4+97,6	2,2+97,8	2,2+97,8	2,4+97,6	2,3+97,7	2,3+97,7
F	4,1+95,9	3,9+96,1	3+97	2,4+97,6	2,5+97,5	2,4+97,6	2,2+97,8	2,4+97,6	2,3+97,7	2,4+97,6	2,5+97,5	2,8+97,2
G	2,3+97,7	4+96	2,3+97,7	3,1+96,9	2,3+97,7	2,6+97,4	2,6+97,4	2,2+97,8	2,3+97,7	2,5+97,5	2,4+97,6	2,3+97,7
H	4,6+95,4	3,4+96,6	3,8+96,2	2,6+97,4	2,4+97,6	2,3+97,7	2,4+97,6	2,6+97,4	2,2+97,8	2,4+97,6	4,1+95,9	3,7+96,3

c	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,5+97,5	2,5+97,5	2,8+97,2	2,7+97,3	5,7+94,3	6,1+93,9	2,7+97,3	3,2+96,8	5,2+94,8	3,6+96,4	2,6+97,4	2,8+97,2
B	3,4+96,6	3,5+96,5	2,9+97,1	3,3+96,7	2,5+97,5	4,9+95,1	4,8+95,2	2,7+97,3	2,9+97,1	2,6+97,4	2,9+97,1	2,7+97,3
C	2,7+97,3	2,9+97,1	3,6+96,4	3,3+96,7	3,3+96,7	4,9+95,1	2,5+97,5	3,9+96,1	2,9+97,1	3,8+96,2	2,5+97,5	3,9+96,1
D	2,8+97,2	3,6+96,4	2,6+97,4	2,6+97,4	2,8+97,2	2,8+97,2	2,6+97,4	3,4+96,6	2,6+97,4	2,6+97,4	3,2+96,8	3,8+96,2
E	3,6+96,4	3,4+96,6	2,6+97,4	3,2+96,8	2,8+97,2	2,7+97,3	3,9+96,1	2,9+97,1	2,6+97,4	2,7+97,3	3,7+96,3	3,5+96,5
F	3,1+96,9	3+97	3+97	2,8+97,2	2,9+97,1	3+97	4+96	2,8+97,2	3,2+96,8	3,2+96,8	3,1+96,9	2,9+97,1
G	3,3+96,7	3,8+96,2	2,4+97,6	2,5+97,5	2,9+97,1	2,8+97,2	2,8+97,2	3,2+96,8	3+97	3,1+96,9	2,9+97,1	3,4+96,6
H	3,8+96,2	3,1+96,9	3+97	3,3+96,7	3,1+96,9	2,8+97,2						blank

d	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,8+97,2	2,7+97,3	2,9+97,1	2,9+97,1	3+97	2,9+97,1	2,7+97,3	3+97	2,8+97,2	3+97	2,9+97,1	3+97
B	3,2+96,8	3+97	3+97	3+97	3+97	3,2+96,8	2,9+97,1	2,7+97,3	3,2+96,8	3+97	2,9+97,1	3,3+96,7
C	2,8+97,2	3,1+96,9	2,8+97,2	3,1+96,9	4,2+95,8	3,1+96,9	3+97	2,8+97,2	3,1+96,9	3,1+96,9	3,2+96,8	3,1+96,9
D	3+97	2,9+97,1	3,5+96,5	2,9+97,1	3+97	2,9+97,1	3,4+96,6	3,9+96,1	3,2+96,8	3+97	3,3+96,7	3,5+96,5
E	3,1+96,9	3+97	3,2+96,8	3+97	3+97	3,2+96,8	3,2+96,8	3,6+96,4	3,3+96,7	3,1+96,9	3,4+96,6	3+97
F	4,2+95,8	3,6+96,4	3+97	3,2+96,8	3,1+96,9	3,3+96,7	3,1+96,9	3,3+96,7	3,1+96,9	4,5+95,5	3,1+96,9	7,7+92,3
G	3,9+96,1	3,6+96,4	3,5+96,5	3,2+96,8	4,6+95,4	3,2+96,8	3,3+96,7	3,4+96,6	3,6+96,4	3,7+96,3	3,7+96,3	3,6+96,4
H	3,8+96,2	3,8+96,2	3,5+96,5	4,2+95,8	3,6+96,4	3,4+96,6	4+96	5+95	4,1+95,9	3,6+96,4	3,8+96,2	3,6+96,4

e	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,4+96,6	2,9+97,1	3,2+96,8	3+97	3,2+96,8	3,5+96,5	3,3+96,7	3,3+96,7	3,4+96,6	3,2+96,8	3,3+96,7	3,3+96,7
B	3,3+96,7	3,2+96,8	3,7+96,3	3,2+96,8	3,4+96,6	3,5+96,5	3,3+96,7	3,6+96,4	3,3+96,7	3,5+96,5	3,8+96,2	3,8+96,2
C	3,4+96,6	3,2+96,8	3,5+96,5	3,8+96,2	3,2+96,8	3,6+96,4	3,6+96,4	3,5+96,5	3,4+96,6	3,6+96,4	3,5+96,5	
D												
E												
F												
G												
H	4+96											

Şekil 4.12: 3000 ng/ml 100 µl lik stok hazırlanması

a: POY1 mikroplak 3000 ng/ml stok DNA sı, b: POY2 mikroplak 3000 ng/ml stok DNA sı, c: POY3 mikroplak 3000 ng/ml stok DNA sı, d: POY4 mikroplak 3000 ng/ml stok DNA sı, e: POY5 mikroplak 3000 ng/ml stok DNA sı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9	a10	a11	a12	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12
B	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10	c11	c12	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12
C	e1	e2	e3	e4	e5	e6	e7	e8	e9	e10	e11	e12	f1	f2	f3	f4	f5	f6	f7	f8	f9	f10	f11	f12
D	g1	g2	g3	g4	g5	g6	g7	g8	g9	g10	g11	g12	h1	h2	h3	h4	h5	h6	h7	h8	h9	h10	h11	h12
E	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9	a10	a11	a12	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12
F	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10	c11	c12	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12
G	e1	e2	e3	e4	e5	e6	e7	e8	e9	e10	e11	e12	f1	f2	f3	f4	f5	f6	f7	f8	f9	f10	f11	f12
H	g1	g2	g3	g4	g5	g6	g7	g8	g9	g10	g11	g12	h1	h2	h3	h4	h5	h6	h7	h8	h9	h10	h11	h12
I	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9	a10	a11	a12	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12
J	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10	c11	c12	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12
K	e1	e2	e3	e4	e5	e6	e7	e8	e9	e10	e11	e12	f1	f2	f3	f4	f5	f6	f7	f8	f9	f10	f11	f12
L	g1	g2	g3	g4	g5	g6	g7	g8	g9	g10	g11	g12	h1	h2	h3	h4	h5	h6	null	null	null	null	null	null
M	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9	a10	a11	a12	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12
N	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10	c11	c12	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12
O	e1	e2	e3	e4	e5	e6	e7	e8	e9	e10	e11	e12	f1	f2	f3	f4	f5	f6	f7	f8	f9	f10	f11	f12
P	g1	g2	g3	g4	g5	g6	g7	g8	g9	g10	g11	g12	h1	h2	h3	h4	h5	h6	h7	h8	h9	h10	h11	h12

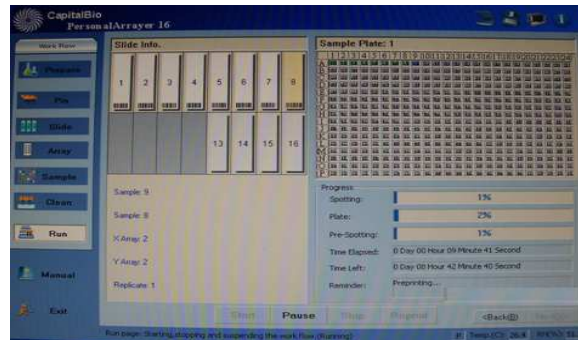
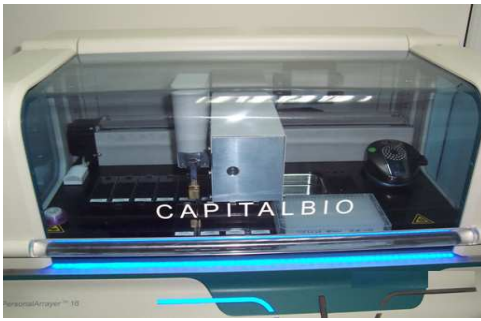
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9	a10	a11	a12	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12
B	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10	c11	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null
C	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null	null

Şekil 4.13: 1000 ng/ml 50 µl hacimde 384 kuyucuklu mikroplakda spotlama öncesi yerleşim planı.

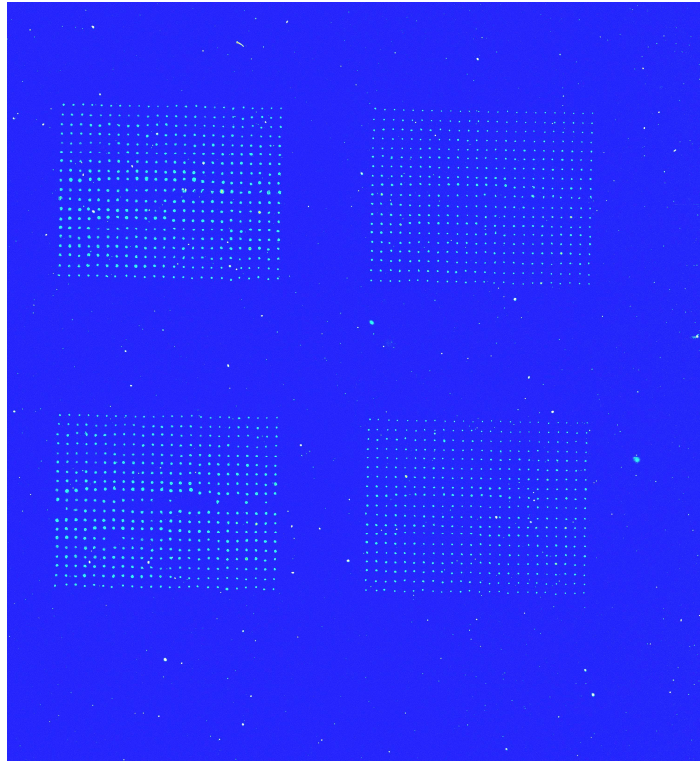
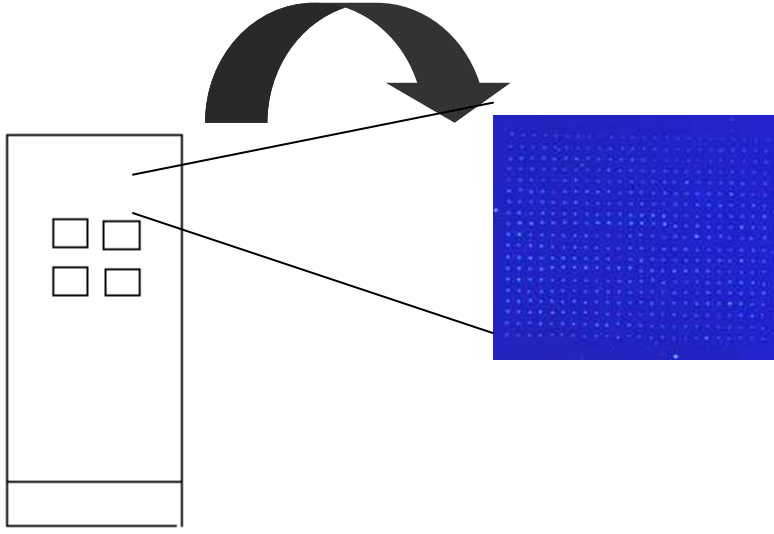
İlk 384 kuyucuklu mikroplakda A-D: POY1 mikroplak içeriği, E-H: POY2 mikroplak içeriği, I-L: POY3 mikroplak içeriği, M-P: POY4 mikroplak içeriği, İkinci 384 kuyucuklu mikroplakda A-B11: POY5 mikroplak içeriği, Null (negatif): 50 µl spotlama tamponu içermektedir.

4.2.6. Mikroarray Lamalarının Üretilmesi

İki adet 384 kuyucuklu mikroplakta 1000 ng/ml konsantrasyonda eşitlemesi yapılan 413 adet BAC / PAC klonuna ait DNA örneklerine dörtlü kopya içerecek şekilde özel tasarlanmış “CapitalBio OPAmينوSlide™” (Pekin, Çin) üzerine “CapitalBio PersonalArrayer™16” (Pekin, Çin) mikroarray yazıcı ile basılma işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4.14.) ve spotların kontrolü “CapitalBio LuxScan™ 10K” (Pekin, Çin) mikroarray tarayıcıda kontrol edildi (Şekil 4.15).



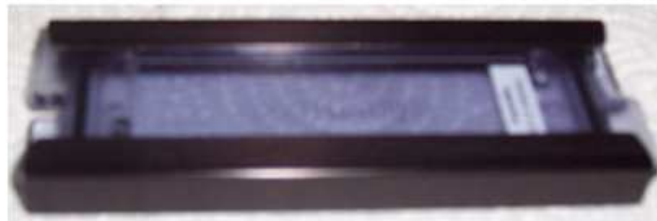
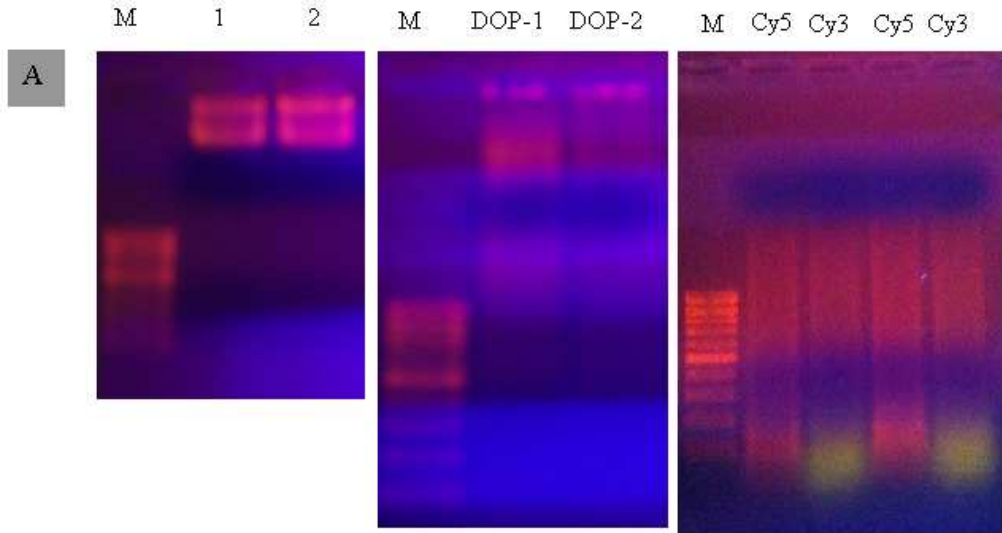
Şekil 4.14: Mikroarray lamalarının üretim aşaması.

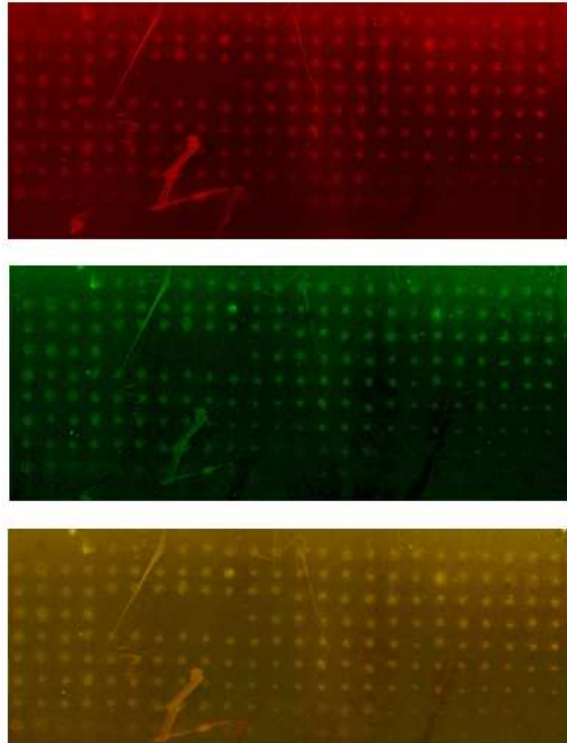
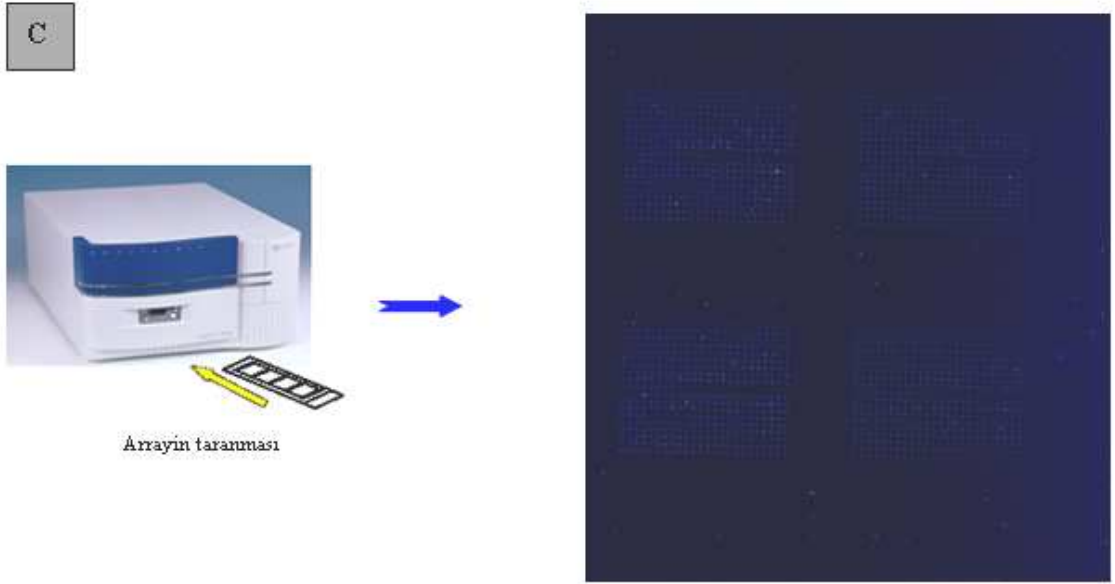


Şekil 4.15: Dörtlü kopya halinde basımı gerçekleştirilen mikroarray lamında basım sonrası tarayıcıda spot kontrolü.

4.2.7. Üretimi Yapılan Mikroarray Lamında aCGH Çalışması

Referans erkek DNA'sı ile referans kadın ve POY hastasına ait DNA örneği için Malzeme ve Yöntem Bölümü 3.3.5. kısmında yer alan yöntem temel alınarak DOP-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyonun gerçekleştiği %1'lik (w/v) agaroz jelde kontrol edildikten sonra (Şekil 4.16.A2), DNA konsantrasyonu, bölüm 3.1.7.2. de yer alan florometrik tayinle belirlendikten sonra DNA miktarları eşitlendi ve bölüm 3.2.3. de yer alan Cyanine-3dUTP (Cyanine 3) ve Cyanine-5dUTP (Cyanine 5) ile işaretleme reaksiyonu uygulandı (Şekil 4.16.A3). İşaretlenmiş DNA örneklerinin çöktürme işlemi için bölüm 3.2.4 de yer alan prosedür uygulandı (Şekil 4.16.B). İşaretlenmiş DNA'nın mikroarrayde hibridizasyonu için bölüm 3.2.5. deki Hibridizasyon protokolü temel alındı (Şekil 4.16.C).





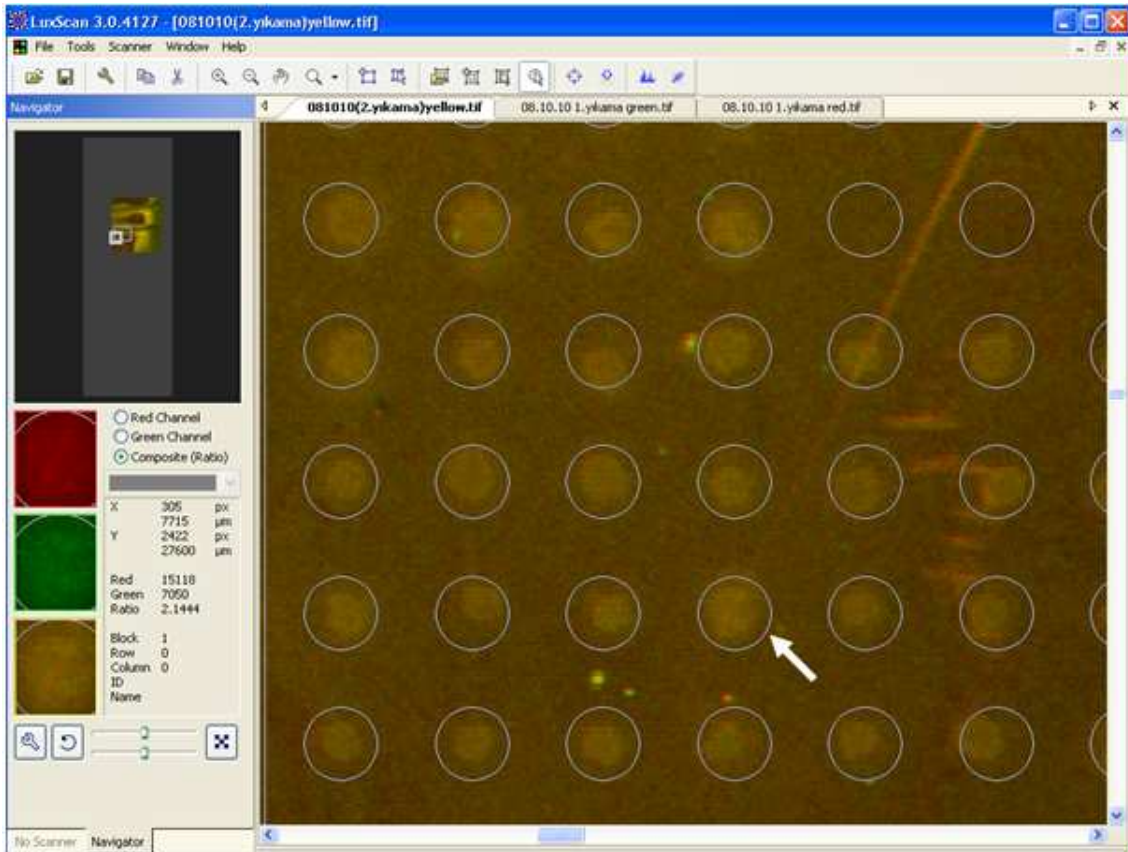
Şekil 4.16: Test ve referans DNA'larının POY için üretilen mikroarrayde hibridizasyonu.

A. Sırasıyla erkek ve kadın genomik DNA'sının (görüntü 1), DOP-PCR ürünlerinin (görüntü 2) ve farklı renkte florokromlarla işaretlenmiş (görüntü 3) DNA örneklerinin %1'lik (w/v) agaroz jelde kontrolü, M: 100 bç markır. B. Farklı renkte işaretlenmiş DNA örneklerinin bir araya getirilerek çöktürülmesi ve mor pelletin eldesi. C. Cy3-dUTP (kırmızı) ve Cy5-dUTP (yeşil) ile işaretlenmiş test ve referans DNA'nın mikroarrayde hibridizasyonu.

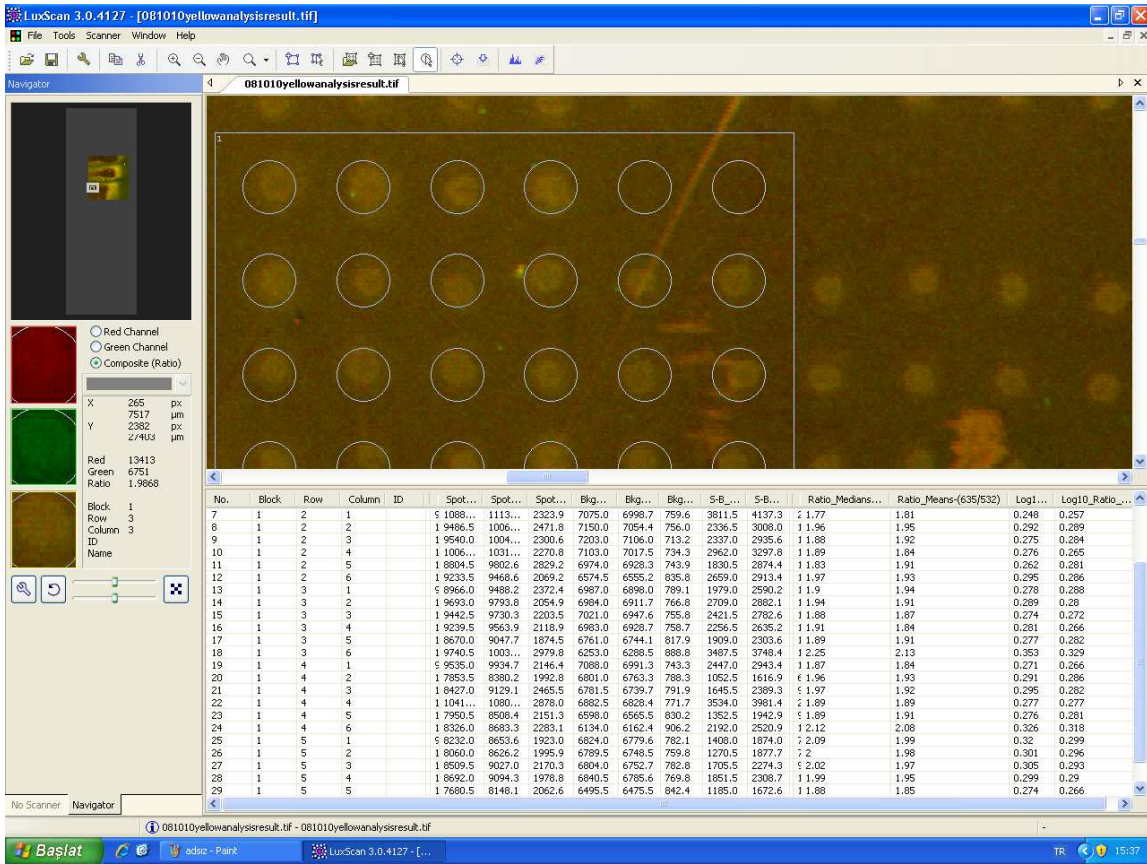
4.2.8. Array CGH Çalışılmış Mikroarray Lamının Mikroarray Tarayıcıda Analizi

POY'a özgün üretimi gerçekleştirilen mikroarray lamında test ve referans DNA'larla yapılan aCGH çalışması sonrasında yıkaması yapıp kurutulan mikroarray lamaları, LuxScan™ 10K (CapitalBio-Pekin, Çin) mikroarray tarayıcıda kırmızı (635 nm) ve yeşil (532 nm) filtrelerde taratıldı ve görüntüler .tiff dosyası olarak kaydedildi. LuxScan™ mikroarray analiz programı kullanılarak, hibridizasyon görüntüsü ile array üzerindeki spotlara ait veri birleştirildi. Her spota ait kırmızı ve yeşil floresan sinyal oranı hesaplandı ve floresan oranlarına göre yorum yapıldı (Şekil 4.17A-B).

A



B



Şekil 4.17: Mikroarray lamının hibridizasyon sonrası mikroarray yazılım programıyla analizi.

- Hibridizasyon sonrası mikroarray tarayıcıda görüntüleri kaydedilen .tif dosyasında analiz programıyla spot sayılarına uygun olarak halkasal mikroarray bloğu oluşturuldu ve hibridizasyon spotlarını içine alacak şekilde yerleştirildi.
- Oluşturulan mikroarray bloğu ile spotlar karşılaştırıldıktan sonra kırmızı (635 nm) ve yeşil (532 nm) floresan sinyal oranları her bir spot için analiz programıyla hesaplandı.

Çalışmada kullanılan POY'lu hasta örneği (XX) ile karşılaştırılan kontrol (referans) örneği erkek (XY) olarak seçildiğinden; array üzerinde yer alan X kromozomuna ilişkin spotlarda gözlenen tüm kırmızı / yeşil oranlarının kırmızı lehine yaklaşık 2 olarak bulunması hasta örneğinin o bölgelere ilişkin CNV içermediği şeklinde yorumlandı. Kontrol amacıyla array

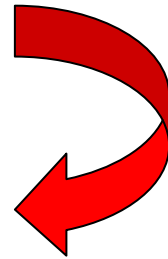
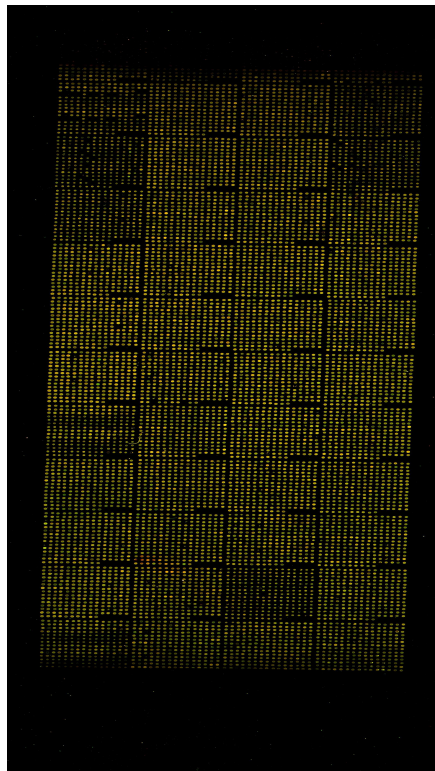
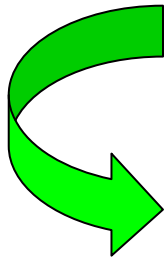
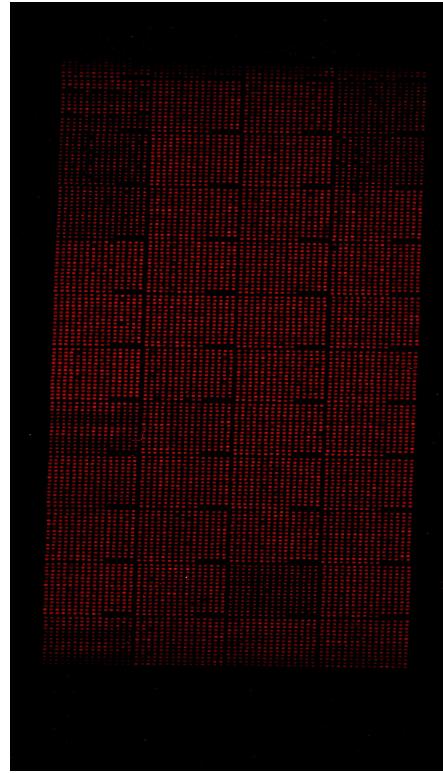
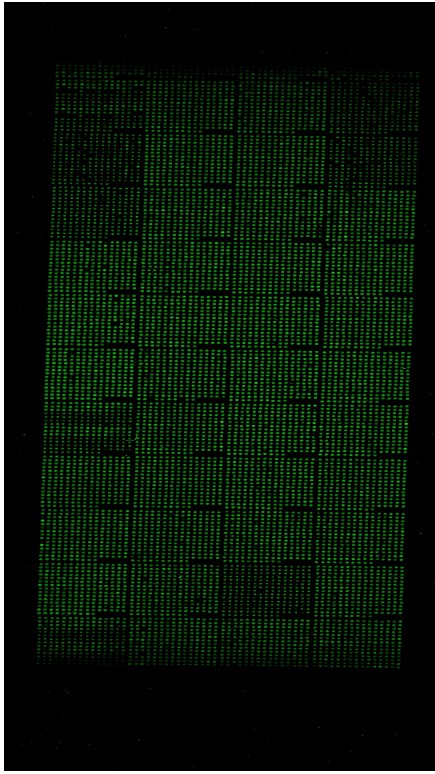
üzerine yerleştirilen ve Y kromozomuna ilişkin bölgeleri içeren spotlar üzerine beklendiği gibi yalnızca yeşil renkli hibridizasyon izlenirken; kontrol DNA'sının içerdiği tek bir Y kromozomunun spot üzerinde anlamlı bir yeşil renk oluşturmadığı ve arkaplan renginden ayırdedilemediği tespit edildi.

Tüm spotların analizinin tamamlanmasıyla, hasta DNA'sında çalışmamızda tasarlanan POY tanısına özgü array CGH ile patoloji saptanmadığı; array içeriğindeki spotların büyük bölümünün X kromozomuna ilişkin bölgeleri içermesi nedeniyle bundan sonraki çalışmalarda kontrol (referans) DNA'sı olarak Normal XX örneği kullanılmasının daha anlamlı olacağı kararına varıldı.

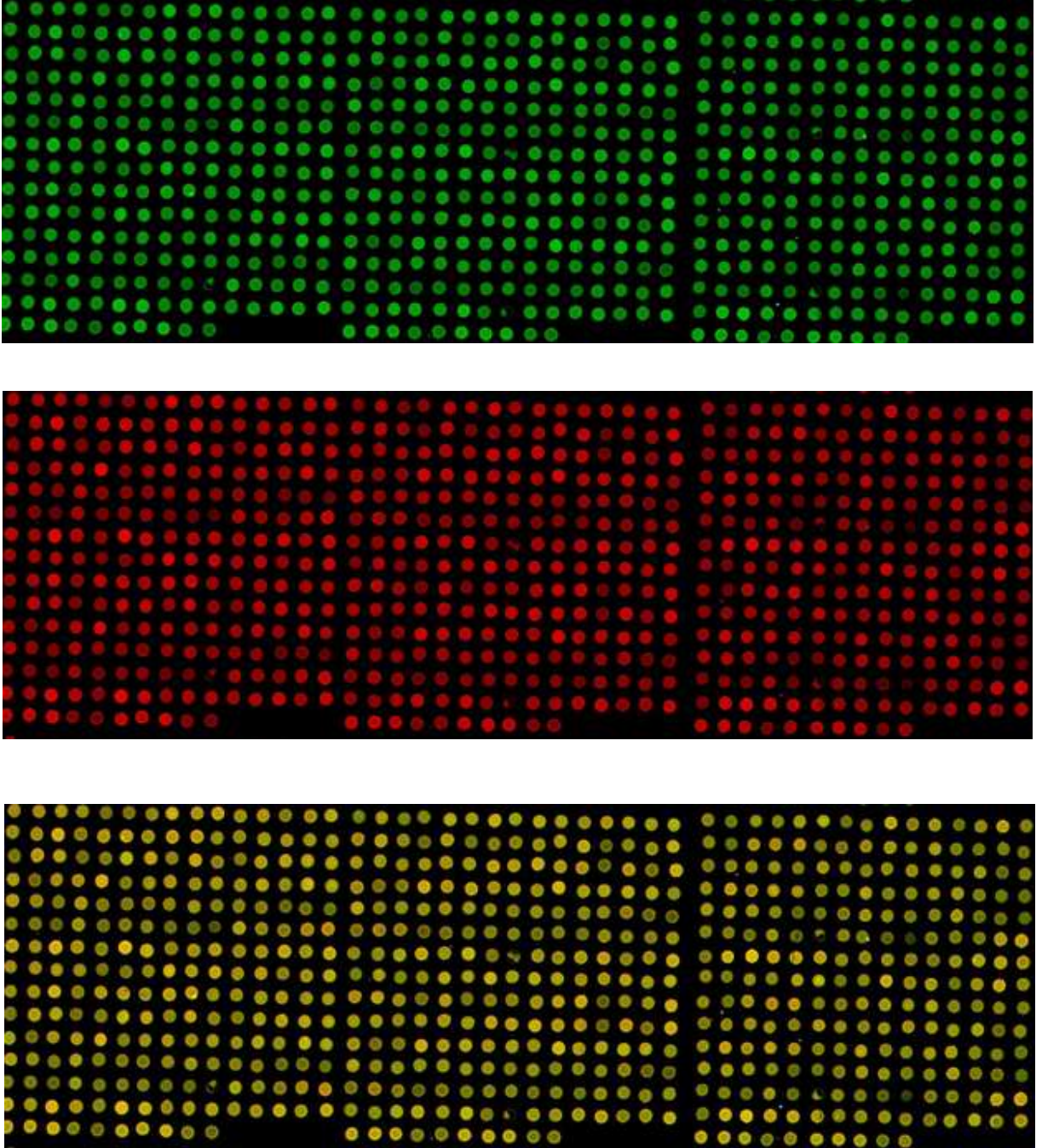
4.2.9. Geliştirdiğimiz Kit Bileşenleri ve aCGH Protokolünün Başka Bir Marka Ticari Arrayde Denenmesi

Tez projesi kapsamında geliştirilen Mikroarray CGH kit ürünleri (Hibridizasyon Tamponu I, Hibridizasyon Tamponu II ve Yıkama Solüsyonları) ve çalışma protokolünün çalıştığına doğrulanması amacıyla, birebir aynı DNA örnekleri ve reaksiyon koşullarında denenmek üzere ticari olarak satılan tüm genom "Constitutional Chip® 4.0" (PerkinElmer, USA) array ile Malzeme ve Yöntem Bölümü 3.2.3., 3.2.5., 3.3.5., kısmında yer alan yöntem temel alınarak aCGH çalışması gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda LuxScan™ 10K (CapitalBio-Pekin, Çin) mikroarray tarayıcıda kırmızı (635 nm) ve yeşil (532 nm) filtrelerde taratılan farklı renkte işaretli DNA örneklerinin array üzerinde hibridizasyonunun gerçekleştiği görüntülendi. Bunun dışında sinyal kalitesi ve arka plan temizliği bakımından değerlendirilen arrayde, geliştirdiğimiz aCGH protokolü ve kit ürünlerinin kullanılmasıyla başarılı sonuç elde edildiğine karar verildi (Şekil 4.18).

A



B



Şekil 4.18: Test ve referans DNA'larının ticari mikroarray üzerinde hibridizasyonu.

A. aCGH çalışılmış mikroarray laminanın hibridizasyon sonrası genel görünümü. B. Cy3-dUTP (kırmızı) ve Cy5-dUTP (yeşil) ile işaretlenmiş test ve referans DNA'nın mikroarrayde hibridizasyonu.

4.2.10. POY Tanısına Yönelik Geliştirilen “Prototip” Kit Bileşenleri

Bu ürün hedefe yönelik olarak tasarlanmış DNA kopya sayısı değişikliklerini (delesyon ve duplikasyonları) belirlemek amacıyla ilgili kromozomal bölgeleri çoklu kopyalar halinde içeren BAC DNA mikroarrayleri ve bunun hibridizasyon ve post hibridizasyon yıkamaları için gerekli malzemeleri içeren kit formatında bir üründür (Şekil 4.19).

4.2.10.1. Metodoloji

poyarray, 393 “Bakteriyal Yapay Kromozom (BAC)” ve 20 “P1 fajı türevli Yapay Kromozom (PAC)” olmak üzere toplam 413 klona ait DNA bölgesini 4’lü kopya içerecek şekilde tasarlanmış, kontrol bölgeleriyle birlikte toplam 1824 spot içeren POY’a özgü mikroarray lamlarının üretimi gerçekleştirilmiştir.

4.2.10.2. Kit İçeriği

- **Array Lamı:** Her lam 4 kopyalı Bakteriyal Yapay Kromozom (BAC) arrayi içermektedir. Santrifüj tüpleri içinde sunulmakta olup tüpler post-hibridizasyon yıkama sırasında kullanılmaktadır.
- **Lamel**
- **Hibridizasyon kaseti**
- **Hibridizasyon Tamponu:** 2 tüp (Her tüp 250 µl hibridizasyon tamponu içerir)
- **Yıkama Solüsyonu 1 :** 1 şişe (Her şişe 250 ml yıkama solüsyonu 1 içerir)
- **Yıkama Solüsyonu 2 :** 1 şişe (Her şişe 250 ml yıkama solüsyonu 2 içerir)
- **Yıkama Solüsyonu 3 :** 1 şişe (Her şişe 250 ml yıkama solüsyonu 3 içerir)
- **Yıkama Solüsyonu 4 :** 1 şişe (Her şişe 250 ml yıkama solüsyonu 4 içerir)
- **Santrifüj tüpü**



Şekil 4.19: POY tanısına yönelik geliştirilen prototip mikroarray CGH kiti.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, POY'a neden olan aday genlerin bulunduğu X ve otozomal kromozomlar üzerindeki lokusları çoklu kopyalar şeklinde içeren POY'a özgün bir "mikroarray CGH" kiti geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda toplam 413 klona ait (393 BAC klonu, 20 PAC klonu) DNA bölgesini dördü kopya içerecek şekilde tasarlanmış, kontrol bölgeleriyle birlikte toplam 1824 spot içeren mikroarray lamalarının üretimi gerçekleştirilmiştir.

Başlangıçta PAC kütüphaneleri ve PAC vektörleriyle yapılan çalışmalar sonucunda, ve pek çok dizileme merkezinden elde edilen verilere göre PAC klon dizilemesinin BAC klon dizilemesine göre daha maliyetli olduğunu ortaya koymuştur. BAC vektörleriyle karşılaştırıldığında; PAC vektörlerinin taşıdığı insert boyutunun (7-8 kb), BAC vektörlerinin taşıdığı insert boyutuna göre (100-150 kb) daha küçük olması, PAC klonları için bir dezavantajdır (Frengen ve diğ., 1999). Bu amaçla tez çalışmamızda POY'a ilişkin gen ve gen dışı bölgeleri içeren klon seçiminde çoğunlukla BAC klonları tercih edilmiştir.

POY'a yönelik çalışmalarda; Aboura ve diğ. (2009), genel 4500 BAC / PAC klonunu iki kopyalı içeren ticari genomik DNA arrayini (Integragen, Evry, France), Tachdjian ve diğ. (2008), 2500 BAC / PAC klonunu iki kopyalı içeren 1 Mb lık Spectral GenomicsTM genomik DNA arrayini (Spectral GenomicsTM, Houston, TX, USA) kullanmışlardır. Ticari satılan genomik DNA arraylerini kullanan bu çalışmalarda; mikroarray CGH çalışmaları sonucunda belirlenen patolojik "Kopya Sayısı Değişimleri (CNV)", CNV veritabanlarında araştırıldıktan sonra çalışma sonucuyla ilgili değerlendirmeye gidilebilmiştir. Sözkonusu çalışmalarda hedefe yönelik arrayler kullanılmamıştır. Bu tez çalışmasında ise hedefe yönelik array tasarlanarak üretilmiş ve POY'a özgü hedef bölgeleri taşıyan genomik klonlara ait CNV bilgisi, kontrol popülasyonlardan elde edilen fenotipik olarak normal bireylere ait DNA örnekleriyle çalışılmıştır. Mikroarray CGH çalışmalarına göre CNV verileri kayıtlı "Database

of Genomic Variants” veritabanında araştırılarak (<http://projects.tcag.ca/variation>), patolojik CNV olarak sınıflandırılan klonlar seçilmiştir. Böylelikle tasarlanan mikroarrayde potansiyel CNV riski elimine edilmiştir.

Nitekim, Yu ve diğ. (2003) tarafından 1p36 bölgesindeki kopya sayısı değişikliklerini incelemek amacıyla 144 BAC / PAC klonundan oluşan hedefe özgü, 1p36 mikroarrayi geliştirmiştir. İnsana ait 1p36 arrayini oluşturmak için; 1p36 kromozomal bölgesine ilişkin 97 klon, 24 kromozomun subtelomerik bölgelerini taşıyan 41 klon, X ve Y kromozomları için de 3'er klon kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda da; 413 klondan 135'i X kromozomuna ait genomik klonları, geri kalanı ise 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21. kromozomlarda POY ile ilişkili bulunmuş ya da POY'a aday gösterilen gen ve gen dışı bölgeleri taşıyan genomik klonları içermektedir. Ayrıca kontrol amaçlı Y kromozomuna ait BAC klonları da yer almaktadır.

Klon sayısının hedefe yönelik olarak sınırlandırılması ürün maliyetinin düşürülmesini sağlamaktadır. CNV riski içermeyen kromozom bölgelerini içermesi de kullanım kolaylığı ve güvenliğini artırmaktadır. Bunlar da ürünün ticarileşme potansiyelini artırmakta ve gelecekte tanı amaçlı olarak kullanılabilmesinin yolunu açmaktadır.

Genomik DNA arraylerinin üretim aşamasında genomik klonlara ait hedef DNA'ların çoğaltılması için farklı stratejiler kullanılmaktadır. Bu stratejiler arasında ligasyon aracılı PCR (Snijders ve diğ., 2001), Phi29 (Φ 29) DNA polimerazını kullanan yuvarlanan halka (“rolling circle amplification” RCA) PCR (Buckley ve diğ., 2002) ve standart DOP-PCR primeri 6MW'nin bir amin ile modifiye edilmiş şeklinin kullanıldığı “degenerate oligonucleotide” PCR (DOP-PCR) (Hodgson ve diğ., 2001) yer almaktadır. Fiegler ve diğ. (2007) yaptıkları çalışmada, insan genomik DNA'sını üç farklı DOP-PCR primeri kullanarak üç PCR reaksiyonu ile hedef DNA'ların çoğaltılmasını gerçekleştirmişlerdir. Bu tez çalışmasında, işaretleme reaksiyonunun verimliliğini arttırmak için test ve referans DNA'ların restriksiyon endonukleazı ile kesime uğratılıp, saflaştırma kiti ile temizlenmesi sonucu yapılan florometrik tayinde, başlangıçtaki DNA miktarında kayıp olduğu ve eldeki DNA'nın işaretleme reaksiyonu için yeterli konsantrasyonda olmadığına karar verildi. Bu amaçla restriksiyon kesimi ile DNA fragmentasyonu yerine, az miktarda DNA örneği ile DNA'nın çoğaltıldığı DOP-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Bundan sonraki aşamada, DNA çoğaltımı sırasında

işaretleme reaksiyonunun da gerçekleştirildiği protokolün optimizasyon çalışmaları hedefler arasındadır.

Dean ve diğ. (2001), vektör DNA'sının (M13, plazmid DNA) tek bir koloniden ya da plaktan çoğaltılabilmesi için dönen halka amplifikasyonu (RCA) metodunu tanımlamışlardır. Çoklu primerli ("multiply-primed") RCA modeli, Φ 29 DNA polimerazı ve rastgele primerler kullanarak DNA çoğaltılmasında 10,000 kat başarı sağlamıştır. RCA yöntemi, halkasal DNA'nın hücre ya da plakdan doğrudan çoğaltılmasını sağlayarak DNA dizilemesinde, prob oluşturulmasında ya da klonlamada kullanılabilir yüksek kalitede kalıp DNA'yı oluşturur. Bu tez çalışmasında BAC / PAC klonlarına ait DNA'nın çoğaltılmasında kalıp DNA'dan ayrılmadan zincirler arası yer değişimiyle DNA sentezini 70,000 nt den daha fazla gerçekleştirebilme kapasitesine sahip (Blanco ve diğ., 1989) Φ 29 DNA polimerazını içeren Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplifikasyon Kiti (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) kullanıldı.

Array üretimi çalışmalarında, BAC / PAC DNA konsantrasyonunun belirlenmesinde Yu ve diğ. (2003) florometrik tayinden yararlanmışlardır. Diehl ve diğ. (2001) de, DNA mikroarraylerinin üretiminde DNA konsantrasyonunu floresan bir boya olan Hoechst-33258 varlığında florometrik tayinle belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında da BAC / PAC klonlarına ait DNA örneklerinin çoğaltımı gerçekleştirildikten sonra, DNA konsantrasyonunun eşitlenmesi için mikroarray geliştirilmesi aşamasında spektrofotometrik ve florometrik tayinlere yönelik çalışmalar yapıldı. Spektrofotometrik tayin sonucu elde edilen verilerle florometrik tayin ile elde edilen değerler karşılaştırıldığında florometrik yöntemin DNA konsantrasyon tayininde daha hassas olduğu saptanarak bu aşamadan itibaren DNA konsantrasyon tayininde, ortamdaki çift iplikli DNA'yı (dsDNA) pikogram düzeyinde belirleyebilme hassasiyetine sahip "PicoGreen" ajanı kullanıldı.

Array üretiminde DNA spotlamasında kullanılan çeşitli ticari robotlar mevcuttur. Bu robotlarda DNA örneklerinin spotlanması için genellikle cam kapiller, metal iğneler (split metal pin) ya da seramik iğneler kullanılmaktadır. Her robot, üretici tarafından belirtilen şekilde kendine özgü spotlama protokollerine sahiptir. Bunun dışında, spotlama tamponunun içeriği ve konsantrasyonu seçilen mikroarray lamalarının yüzey kimyasıyla ilişkilidir. Array

üretiminde genellikle DNA ve cam yüzey arasındaki iyonik etkileşime katkı sağlayan aminosilan, poli-L-lizin ya da krom-kaplı mikroskop lamaları kullanılır.

Fiegler ve diğ. (2007) yaptıkları çalışmada array spotlamasında Microgridder II (Biorobotics) mikroarray yazıcısını ve amin-modifiye DNA'nın kovalent olarak bağlanmasını sağlayan reaktif ester gruplarını içeren hidrofilik polimerle kaplı "CodeLink activated slides (GE Healthcare)" mikroarray lamalarını kullanmışlardır. Yu ve diğ. (2003) insana özgü "1p36" arraylerinin basımında "OmniGrid Accent Microarrayer" (GeneMachine) kullanarak, alkalın/asit temizlenmiş ve Bis (Triklorosilil) oktan ile muamele edilmiş cam lam üzerinde gerçekleştirmişlerdir. Diehl ve diğ. (2001) de DNA mikroarrayleri için poli-L-lizin kaplı lam ile aminosilan kaplı (CMT-GAPSTM, Corning, USA) lamalar kullanmışlardır. DNA spotlamasını tekli SMP3 pin (TeleChem International Inc., Sunnyvale, USA) kullanarak SDDC-2 DNA Micro-Arrayer (Toronto, Canada) robotu ile gerçekleştirmişlerdir. Spotlama tamponu olarak 3XSSC, 3XSSC / betain ve ticari ürün olan "ArrayItTM micro-spotting solution" (TeleChem International) test edilmiştir. Dört kopyalı basılan spotların sinyal : arka plan kirliliği (noise) oranları hesaplandığında 3XSSC / betain için 0.7 (\pm 0.2), 3XSSC için 5.1 (\pm 0.8) ve ArrayItTM spotlama tamponu için 10.5 (\pm 1.5) sinyal etkinlik oranı hesaplanmıştır. Bu tez çalışmasında da, 50 μ l son hacimde 500, 1000, 1500 ng/ml konsantrasyonda 3XSSC, 3XSSC / %50 DMSO ve CapitalBio DNA Spotting BufferTM (Pekin, Çin) ile sulandırımı yapılan DNA örnekleri aminosilan kaplı CapitalBio OPAMinoSlideTM (Pekin, Çin) mikroarray lamalarına tek metal pinle PersonalArrayerTM16 (CapitalBio-Pekin, Çin) mikroarray yazıcı kullanılarak array lamına dört kopyalı olacak şekilde basıldı. Üretimi gerçekleştirilen mikroarray lamalarına basılan spotlar; kalite kontrol çalışmaları kapsamında boyut, şekil, homojenite ve sinyal kalitesi bakımından karşılaştırıldığında "CapitalBio DNA Spotlama Tamponu (Pekin, Çin)" kullanılarak 1000 ng/ml konsantrasyona sulandırılarak basılmış spotların uygun olduğuna karar verildi.

Array-CGH çalışmalarında test (hasta DNA'sı) ve referans genomik DNA'sının farklı renkte işaretlenmesinde genellikle Cyanine3 dCTP (Cy3) ve Cyanine5 dCTP (Cy5) florokromları kullanılmaktadır. İyi bir işaretleme ve hibridizasyon sonucu elde edebilmek için yüksek kalitede ($280/260 > 1.8$) ve eşit konsantrasyonda genomik DNA'ya gereksinim duyulmaktadır. İşaretleme reaksiyonlarında genel olarak tercih edilen yaklaşım, rastgele seçilmiş primerlerle işaretleme ile Cy-boyalalarının genomik DNA'yı işaretlemesidir. Cy3 ve Cy5, DNA işaretlemesinde en sık kullanılan florokromlar olmasına rağmen her iki boya da yüksek ozon ya da nem düzeyi gibi çevresel koşullara oldukça hassastırlar (Fare ve diğ., 2003).

Array lamalarında CGH çalışması için test ve referans genomik DNA'sının farklı renkteki florokromlarla işaretlenmesinde Yu ve diğ. (2003) "BioPrime DNA Labeling kit" (Invitrogen) kullanarak Cy3-dCTP ve Cy5-dCTP (NEN) ile işaretleme yapmışlardır. Array hibridizasyonu için 250 ng konsantrasyondaki işaretlenmiş genomik DNA örnekleri $\sim 50 \mu\text{g}$ insan Cot-1 DNA'sı varlığında birlikte çöktürülmüş ve pellet; %50 formamid, 2XSSC, %10 dekstran sülfat, %0.2 SDS ve "ULTRAhyb buffer" (Ambion) içerikli hibridizasyon tamponunda sulandırılarak mikroarraye hibridize edilmiş ve 37°C de 22-26 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tachdjian ve diğ. (2008) de referans ve test DNA'sının Cy3 ve Cy5 ile işaretlenmesinde "Invitrogen BioPrime random labeling kit" kullanmışlardır. $50 \mu\text{g}$ insan Cot-1 DNA'sı ve $30 \mu\text{g}$ Salmon sperm DNA'sı varlığında işaretlenmiş DNA örnekleri mikroarrayde 37°C de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aboura ve diğ. (2009), test ve referans DNA'larının Cy3 ve Cy5 ile işaretlenmesinde "BioPrime random labeling kit (Invitrogen, San Diego, CA)" kullanmışlardır. İşaretlenmiş test ve referans DNA'sı $50 \mu\text{g}$ insan Cot-1 DNA ve $30 \mu\text{g}$ Salmon sperm DNA varlığında bir araya getirilmiş, tekrarlanan dizilerin bloke edilmesi sonrasında 37°C de 48 saat hibridizasyona bırakmışlardır.

Tez çalışmamızda, test ve referans DNA'nın işaretlenmesinde Cy3-dUTP ve Cy5-dUTP nükleotid karışımı (Enzo Life Sciences) ile BioPrime random labeling kit (Invitrogen) kullanıldı. İşaretlenmiş DNA örnekleri, Medimiks AR-GE Laboratuvarında daha önce yürütülen EUREKA ve TEYDEB projeleri kapsamında geliştirilmiş olan Hibridizasyon Tamponu 1 varlığında çöktürülüp, Hibridizasyon Tamponu 2 (20XSSC, % 1 SDS ve diğ. bileşenleri içeren) ile sulandırılıp mikroarray lamına uygulandı ve tekrarlı diziler bloke edildikten sonra 37°C de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Hibridizasyon sonrasında yine

Medimiks AR-GE Laboratuvarında geliştirilen Yıkama Tamponları ile array üzerinde hibridizasyona uğramamış bileşenlerin uzaklaştırılması için yıkama aşamasından geçirilip kurutuldu. Hibridizasyon sonrası yıkaması yapıp kurutulan mikroarray lamları, LuxScan™ 10K (CapitalBio-Pekin, Çin) mikroarray tarayıcıda tarandı.

Yu ve diğ. (2003)'nin gerçekleştirdiği array CGH çalışmasında, fenotipik olarak normal bir erkek ve normal bir kadına ait periferik kandan izole edilmiş genomik DNA, referans olarak kullanılmıştır. Tachdjian ve diğ. (2008), Aboura ve diğ. (2009) yer aldıkları çalışmalarda referans DNA olarak bilinen kromozomal bir dengesizliği olmayan erkek / kadın genomik DNA'larını kullanmışlardır. Çalışmamızda kontrol amacıyla array üzerine yerleştirilen ve Y kromozomuna ilişkin bölgeleri içeren spotlar üzerine beklendiği gibi yalnızca yeşil renkli hibridizasyon izlenirken; kontrol DNA'sının içerdiği tek bir Y kromozomunun spot üzerinde anlamlı bir yeşil renk oluşturmadığı ve arka plan renginden ayırdedilemediği tespit edildiğinden çalışmamızda tasarlanan array içeriğindeki spotların büyük bölümünün X kromozomuna ilişkin bölgeleri içermesi nedeniyle bundan sonraki çalışmalarda kontrol (referans) DNA'sı olarak NORMAL XX örneği kullanılmasının daha anlamlı olacağı değerlendirildi.

Portnoi ve diğ. (2006) tarafından yapılan çalışmada, 90 POY'lu kadın ile 20 kontrol karşılaştırılmıştır. Periferik kan örneklerinden standart sitogenetik metodlarıyla metafaz kromozomları hazırlanmıştır. Prematür ovaryum yetmezliğinde kritik öneme sahip Xq kromozomal mikro-düzenlenmelerin saptanabilmesi için Xq13-q27 bölgelerini içeren seçilmiş 30 bakteriyal yapay kromozom (BAC) ve P1 yapay kromozom (PAC) klonları kullanılarak FISH analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak 90 hastanın %8.8'inde kromozomal anormallikler saptanabilmiş ve Xq bölgesini etkileyen submikroskopik kromozomal mikro-düzenlenmeler FISH analiziyle elde edilememiştir. DNA mikroarraylerinin kullanılmasıyla POY'da yer alan kritik Xq bölgelerinin belirlenmesine yardımcı olabileceği öngörülmüştür (Portnoi ve diğ., 2006).

Tachdjian ve diğ. (2008) tarafından yapılan çalışmada POY'la ilişkili X kromozomu delesyonlarının karakterize edilebilmesi için yüksek çözünürlükte genom analizi yapılmıştır. Çalışmada, geleneksel sitogenetik yöntemlerle terminal Xq delesyonları belirlenmiş 3 POY hastası yer almıştır. 1 Mb çözünürlükte array CGH ve FISH tekniği kullanılmıştır. Mikroarray CGH ve FISH çalışmaları sonucu üç delesyon (del(X)(q21.2), del(X)(q21.31) ve del(X)(q22.33)) karakterize edilmiştir. Mikroarray CGH, del(X)(q21.31)'in *SHOX* (Short Stature Homeobox Gene) genini içeren Xpter duplikasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, POY hastalarında mikroarray kullanımına yönelik ilk çalışmadır. Bu çalışmada otozomlara ait delesyon ve duplikasyonlar ele alınmamış olup, olası X kromozomu delesyonlarının duplikasyon gibi diğer kromozomal dengesizliklerle ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Tachdjian ve diğ., 2008).

Aboura ve diğ. (2009) tarafından yapılan çalışmada POY tanısı almış 99 kadında geleneksel karyotip analizi ve 4500 BAC klonundan oluşan DNA mikroarrayi uygulanmıştır. 3'ü X kromozomu, 28'i otozomal kromozomlar üzerinde olmak üzere toplam 31 CNV belirlenmiştir. Veriler, "Database of Genomic Variants" (<http://projects.tcag.ca/variation>) veritabanında kontrol popülasyonlarla karşılaştırıldığında istatistiksel öneme sahip 8 farklı kromozomal bölgede (1p21.1, 5p14.3, 5q13.2, 6p25.3, 14q32.33, 16p11.2, 17q12 ve Xq28) CNV saptanmıştır. Beyaz ırk POY hastaları arasında yapılan bu çalışma, geniş toplulukta CNV analizine yönelik rapor edilen ilk çalışmadır. Rapor edilen 8 CNV içinde üremeye rol alan 5 POY aday geni bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda POY tanısı almış bir hasta kullanılmış ve mikroarrayimiz üzerinde yer alan POY'a spesifik herhangi bir bölgede kopya sayısı değişikliği gözlenmemiştir. Hastada, annesindeki "ataxia cerebellosa" öyküsü nedeniyle POY gelişmiş olabileceği gibi; bu hasta, patolojik CNV içermeyen POY olgularından biri olarak da kabul edilebilir. Nitekim, Aboura ve diğ. (2009) çalışmasında, POY tanısı almış 99 kadında yapılan çalışmada sadece 31 CNV bulunmuş bunun da 8 tanesinin yani yaklaşık dörtte bir kadarının patolojik olduğu değerlendirilmiştir. Bu sonuç, Portnoi ve diğ. (2006) tarafından yapılan çalışmada, 90 hastanın %8.8'inde kromozomal anomalilerin saptanabilmiş olması ile uyumludur.

Bu tez çalışmasında geliştirilen mikroarray ile diğer çalışmalarda kullanılan sayıda POY tanısı almış hasta örneğiyle tarama yapılması durumunda benzer oranlar beklenmelidir.

Burada üzerinde durmak istediğimiz önemli bir nokta ise Aboura ve diğ. (2009)'nin 4500 farklı BAC klonu içeren mikroarrayle çalışmasında bulunan CNV'lerin dörtte üçünün patolojik olmayıp, polimorfik değişiklikler olmasıdır. Bu durum, mikroarray tasarımının öncesinde "Database of Genomic Variants" veritabanından araştırma yapılmasının önemini göstermektedir. Böylelikle hem çalışma sonunda kullanıcı tarafından tekrar tarama yapılması zorunluluğunu ortadan kaldırdığından analiz süresi kısalmakta hem de daha az sayıda fakat anlamlı klon kullanılması nedeniyle mikroarray maliyeti azalmaktadır. Nitekim bizim geliştirdiğimiz mikroarray hem POY hastalığına spesifik kromozomal bölgelerden oluşması bakımından, hem de CNV taraması yapıldıktan sonra üretildiğinden; analiz süresi diğer genel amaçlı mikroarraylerden kısa ve maliyeti de daha düşüktür.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında POY'a aday gösterilen gen ve gen dışı bölgeleri çoklu kopyalar halinde içeren POY'a özgün bir "mikroarray CGH" kiti geliştirildi. POY tanısı almış hasta ve sağlıklı kontrol bireylere ait DNA örnekleriyle yapılan array CGH çalışması sonucunda, hibridizasyonun elde edilmesiyle üretimi gerçekleştirilen mikroarray lamalarının çalıştığı gösterilmiş oldu. Genomik klonların "Database of Genomic Variants" veritabanında CNV verileri taranarak seçilmiş olması, potansiyel CNV riskini ortadan kaldırmış oldu. Bu özelliğiyle de kullanım kolaylığı ve güvenliğini arttırarak, ürünün gelecekteki ticarileşme potansiyelinin yolu açılmış oldu. Bundan sonraki aşama, POY tanısı almış geniş hasta gruplarında yapılacak tarama çalışmaları ile Türk toplumundaki POY etiyolojisi ve görülme sıklığına yönelik bilgilerin elde edilmesi açısından katkı sağlayacaktır. Bunun yanısıra prototipi geliştirilen ürün, infertilitenin erken ve önemli etkenlerinden biri olan ailesel POY'un erken tanısına ve erken menopozun önceden belirlenmesine fırsat verip, oosit vitrifikasyonu, embriyoların dondurulması ya da daha erken yaşta çocuk sahibi olma gibi seçeneklere olanak tanıyacaktır. Bu yönleriyle dünyada ürünün bir eşdeğeri bulunmamakta olup, infertilite alanında tanısal ve prognostik yönleriyle yaygın olarak kullanılacak bir *in vitro* diagnostik test olmaya adaydır.

KAYNAKLAR

- AALTONEN, J., LAITINEN, M.P., VOIJOLAINEN, K., JAATINEN, R., HORELLI-KUITUNEN, N., SEPPA, L., LOUHIO, H., TUURI, T., SJOBERG, J., BUTZOW, R., HOVATA, O., DALE, L., RITVOS, O., 1999, Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Vol.84, No.8, 2744-2750.
- ABDELHALEEM, M., MALTAIS, L., WAIN, H., 2003, The human DDX and DHX gene families of putative RNA helicases, *Genomics*, Vol.81, No.6, 618-622.
- ABOURA, A., DUPAS, C., TACHDJIAN, G., PORTNOI, M.F., BOURCIGAUX, N., DEWAILLY, D., FRYDMAN, R., FAUSER, B., RONCI-CHAIX, N., DONADILLE, B., BOUCHARD, P., CHRISTIN-MAITRE, S., 2009, Array Comparative Genomic Hybridization Profiling Analysis Reveals Deoxyribonucleic Acid Copy Number Variations Associated with Premature Ovarian Failure, *J Clin Endocrinol Metab.*, Vol.94, No.11, 4540-4546.
- AHONEN, P., KOSKIMIES, S., LOKKI, M.L., TIILIKAINEN, A., PERHEENTUPA, J., 1988, The expression of autoimmune polyglandular disease type 1 appears associated with several HLA-A antigens but not with HLADR, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol.66, No.6, 1152-1157.
- AHONEN, P., MYLLARNIEMI, S., SIPILA, L., PERHEENTUPA, J., 1990, Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasisectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients, *N Engl J Med*, Vol.322, No.26, 1829-1836.
- AITTOMAKI, K., LUCENA, J.L., PAKARINEN, P., SISTONEN, P., TAPANAINEN, J., GROMOLL, J., KASKIKARI, R., SANKILA, E.M., LEHVASLAIHO, H., ENGEL, A.R., NIESCHLAG, E., HUHTANIEMI, I., DE LA CHAPELLE, A., 1995, Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure, *Cell*, Vol.82, No.6, 959-968.
- AITTOMAKI, K., HERVA, R., STENMAN, U.H., JUNTUNEN, K., YLOSTALO, P., HOVATTA, O., DE LA CHAPELLE, A., 1996, Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene, *J. Clin. Endocr. Metab.*, Vol.81, No.10, 3722-3726.
- ALBRIGHT, F., SMITH, P.H., FRASER, R., 1942, A syndrome characterized by primary ovarian insufficiency and decreased stature, *American Journal of the Medical Sciences*; Vol.204, 625-648.

- ALLINGHAM-HAWKINS, D.J., BABUL-HIRJI, R., CHITAYAT, D., HOLDEN, J.J.A., YANG, K.T., LEE, C., HUDSON, R.H.G., NOLIN, S.L., GLICKSMAN, A., JENKINS, E.C., BROWN, W.T., HOWARD-PEEBLES, P.N., BECCHI, C., CUMMINGS, E., FALLON, L., SEITZ, S., BLACK, S.H., VIANNA-MORGANTE, A.M., COSTA, S.S., OTTO, P.A., MINGRONI-NETTO, R.C., MURRAY, A., WEBB, J., VIERI, F., MACSWINNEY, F., DENNIS, N., JACOBS, P.A., SYRROU, M., GEORGIU, I., PATSALIS, P.C., GIOVANNUCCI UZIELLI, M.L., GUARDUCCI, S., LAPI, E., CECCONI, A., RICCI, U., RICOTTI, G., BIONDI, C., SCARSELLI, B., 1999, Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the international collaborative POF in fragile X study preliminary data, *Am J Med Genet*, Vol.83, No.4, 322-325.
- ANASTI, J.N., 1998, Premature ovarian failure: an update, *Fertil. Steril.*, Vol.70, No.1, 1-15.
- ANASTI, J.N., KALANTARIDOU, S.N., KIMZEY, L.M., DEFENSOR, R.A., NELSON, L.M., 1998a, Bone loss in young women with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure, *Obstet Gynecol*, Vol.91, No.1, 12-15.
- ANDERSON, M.J., VIARS, C.S., CZEKAY, S., CAVENEE, W.K., ARDEN, K.C., 1998, Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily, *Genomics*, Vol.47, 187-199.
- ARNESON, N., HUGHES, S., HOULSTON, R., DONE, S., 2008, Whole genome amplification by degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR), *Cold Spring Harb. Protoc.*, Chapter 18, Scion Publishing Ltd., Oxfordshire, UK.
- ASHLEY, C.T., SUTCLIFFE, J.S., KUNST, C.B., LEINER, H.A., EICHLER, E.E., NELSON, D.L., WARREN, S.T., 1993, Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat, *Nature Genet.*, Vol.4, No.3, 244-251.
- ATRIA, A., 1950, La menopausia precoz y tratamiento hormonal, *Rev Med Chil*, Vol.78, No.6, 373-7.
- BACHELOT, A., MEDURI, G., MASSIN, N., MISRAHI, M., KUTTENN, F., TOURAINE, P., 2005, Ovarian steroidogenesis and serum androgen levels in patients with premature ovarian failure, *J Clin Endocrinol Metab.*, Vol.90, No.4, 2391-2396.
- BINES, J., OLESKE, D.M., COBLEIGH, M.A., 1996, Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer, *J Clin Oncol*, Vol.14, No.5, 1718-1729.

- BIONE, S., SALA, C., MANZINI, C., ARRIGO, G., ZUFFARDI, O., BANFI, S., BORSANI, G., JONVEAUX, P., PHILLIPE, C., ZUCCOTTI, M., BALLABIO, A., TONIOLO, D., 1998, A human homologue of the *Drosophila melanogaster* diaphanous gene is disrupted in a patient with premature ovarian failure: evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility, *Am. J. Hum. Genet.*, Vol.62, No.3, 533-541.
- BIONE, S., RIZZOLIO, F., SALA, C., RICOTTI, R., GOEGAN, M., MANZINI, M.C., BATTAGLIA, R., MAROZZI, A., VEGETTI, W., DALPRÀ, L., CROSIGNANI, P.G., GINELLI, E., NAPPI, R., BERNABINI, S., BRUNI, V., TORRICELLI, F., ZUFFARDI, O., TONIOLO, D., 2004, Mutation analysis of two candidate genes for premature ovarian failure, DACH2 and POF1B, *Hum. Reprod.*, Vol.19, No.12, 2759-2766.
- BJORSES, P., PELTO-HUIKKO, M., KAUKONEN, J., AALTONEN, J., PELTONEN, L., ULMANEN, I., 1999, Localization of the APECED protein in distinct nuclear structures, *Hum Molec. Genet.*, Vol.8, No.2, 259-266.
- BJORSES, P., HALONEN, M., PALVIMO, J.J., KOLMER, M., AALTONEN, J., ELLONEN, P., PERHEENTUPA, J., ULMANEN, I., PELTONEN, L., 2000, Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein, *Hum. Genet.*, Vol.66, No.2, 378-392.
- BOARD, J.A., REDWINE, F.O., MONCURE, C.W., FRABLE, W.J., TAYLOR, J.R., 1979, Identification of differing etiologies of clinically diagnosed premature menopause, *Am J Obstet Gynecol*, Vol.134, 936-944.
- BODEGA, B., PORTA, C., CROSIGNANI, P.G., GINELLI, E., MAROZZI, A., 2004, Mutations in the coding region of the FOXL2 gene are not a major cause of idiopathic premature ovarian failure, *Mol. Hum. Reprod.*, Vol.10, No.8, 555-557.
- BODIN, L., DI PASQUALE, E., FABRE, S., BONTOUX, M., MONGET, P., PERSANI, L., MULSANT, P., 2007, A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep, *Endocrinology*, Vol.148, No.1, 393-400.
- BONDY, C.A., NELSON, L.M., KALANTARIDOU, S.N., 1998, The Genetic origins of ovarian failure, *J Womens Health*, Vol.7, No.10, 1225-1229.
- BRAAT, D.D.M., SMITS, A.P.T., TOMAS, C.M.G., 1999, Menstrual disorders and endocrine profiles in fragile X carriers prior to 40 years of age: a pilot study, *Am J Med Genet*, Vol.83, 327-328.

- BROWN, C.J., LAFRENIERE, R.G., POWERS, V.E., SEBASTIO, G., BALLABIO, A., PETTIGREW, A.L., LEDBETTER, D.H., LEVY, E., CRAIG, I.W., WILLARD, H.F., 1991, Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13, *Nature*, Vol.349, No.6304, 82-84.
- BROWN, W.T., 2002, *The molecular biology of the fragile X mutation*, In *Fragile X Syndrome Diagnosis, Treatment, and Research*, (3rd ed.), Hagerman, R.J., Hagerman, P.J. (ed.), MD: The Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp.110-135.
- BRUDER, C.E., HIRVELA, C., TAPIA-PAEZ, I., FRANSSON, I., SEGRAVES, R., HAMILTON, G., ZHANG, X.X., EVANS, D.G., WALLACE, A.J., BASER, M.E., ZUCMAN-ROSSI, J., HERGERSBERG, M., BOLTSHAUSER, E., PAPI, L., ROULEAU, G.A., POPTODOROV, G., JORDANOVA, A., RASK-ANDERSEN, H., KLUWE, L., MAUTNER, V., SAINIO, M., HUNG, G., MATHIESEN, T., MÖLLER, C., PULST, S.M., HARDER, H., HEIBERG, A., HONDA, M., NIIMURA, M., SAHLEN, S., BLENNOW, E., ALBERTSON, D.G., PINKEL, D., DUMANSKI, J.P., 2001, High resolution deletion analysis of constitutional DNA from neurofibromatosis type 2 (NF2) patients using microarray-CGH, *Hum Mol Genet*, Vol.10, No.3, 271-282.
- BRUNET, A., BONNI, A., ZIGMOND, M.J., LIN, M.Z., JUO, P., HU, L.S., ANDERSON, M.J., ARDEN, K.C., BLENIS, J., GREENBERG, M.E., 1999, Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor, *Cell*, Vol.96, 857-868.
- BUCKLER, H., 2005, The menopause transition: endocrine changes and clinical symptoms, *Menopause Int*, Vol.11, 61-65.
- BUCKLEY, P.G., MANTRIPRAGADA, K.K., BENETKIEWICZ, M., TAPIA-PAEZ, I., DIAZ DE STAHL, T., ROSENQUIST, M., ALI, H., JARBO, C., DE BUSTOS, C., HIRVELA, C., SINDER WILEN, B., FRANSSON, I., THYR, C., JOHNSON, B.I., BRUDER, C.E., MENZEL, U., HERGERSBERG, M., MANDAHL, N., BLENNOW, E., WEDELL, A., BEARE, D.M., COLLINS, J.E., DUNHAM, I., ALBERTSON, D., PINKEL, D., BASTIAN, B.C., FARUQI, A.F., LASKEN, R.S., ICHIMURA, K., COLLINS, V.P., DUMANSKI, J.P., 2002, A full-coverage, high-resolution human chromosome 22 genomic microarray for clinical and research applications, *Hum. Mol. Genet.*, Vol.11, No.25, 3221-3229.
- BURGER, H.G., 1994, Diagnostic role of follicle-stimulating hormone (FSH) measurements during the menopausal transition-an analysis of FSH, oestradiol and inhibin, *Eur J Endocrinol*, Vol.130, 38-42.
- BURGER, H.G., DUDLEY, E.C., ROBERTSON, D.M., DENNERSTEIN, L., 2002, Hormonal changes in the menopause transition, *Recent. Prog. Horm. Res.*, Vol.57, 257-275.
- BUSSANI, C., PAPI, L., SESTINI, R., BALDINOTTI, F., BUCCIANTINI, S., BRUNI, V., SCARSELLI, G., 2004, Premature ovarian failure and fragile X premutation: a study on 45 women, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; Vol.112, No.2, 189-191.

- CAGLAR, G.S., ASIMAKOPOULOS, B., NIKOLETTOS, N., DIEDRICH, K., AL-HASANI, S., 2005, Recombinant LH in ovarian stimulation, *Reprod Biomed Online*, Vol.10, No.6, 774-785.
- CALVIN, N.M. ve HANAWALT, P.C., 1988, High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation, *J. Bacteriol.*, Vol.170, No.6, 2796-2801.
- CASPERSSON, T., FARBER, S., FOLEY, G.E., KUDYNOWSKI, J., MODEST, E.J., SIMONSSON, E., WAGH, U., ZECH, L., 1968, Chemical differentiation along metaphase chromosomes, *Exp. Cell Res.*, Vol.49, No.1, 219-222.
- CASTRILLON, D.H., MIAO, L., KOLLIPARA, R., HORNER, J.W., DEPINHO, R.A., 2003, Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a, *Science* (New York, NY), Vol.301, No.5630, 215–218.
- CHANG, H., BROWN, C.W., MATZUK, M.M., 2002, Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily, *Endocr Rev*, Vol.23, No.6, 787–823.
- CHAPPEL, S.C. ve HOWLES, C., 1991, Reevaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the ovulatory process, *Hum Reprod.*, Vol.6, No.9, 1206-1212.
- CHEN, Y.T., MATTISON, D.R., FEIGENBAUM, I., FUKUI, H., SCHULMAN, J.D., 1981, Reduction in oocyte number of following prenatal exposure to a diet high in galactose, *Science*, Vol.214, No.4525, 1145-7.
- CHOI, Y., RAJKOVIC, A., 2006, Characterization of NOBOX DNA binding specificity and its regulation of Gdf9 and Pou5f1 promoters, *J Biol Chem*, Vol.281, No.47, 35747–3756.
- COULAM, C.B., ADAMSON, S.C., ANNEGERS, J.F., 1986, Incidence of premature ovarian failure, *Obstet. Gynecol*, Vol.67, No.4, 604-606.
- D'ANDREA, A. ve PELLMAN, D., 1998, Deubiquitinating enzymes: a new class of biological regulators, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, Vol.33, No.5, 337-352.
- DAVISON, R.M., QUILTER, C.R., WEBB, J., MURRAY, A., FISHER, A.M., VALENTINE, A., SERHAL, P., CONWAY, G.S., 1998, A familial case of X chromosome deletion ascertained by cytogenetic screening of women with premature ovarian failure, *Hum Reprod*, Vol.13, 3039–3041.
- DAVISON, R.M., FOX, M., CONWAY, G.S., 2000, Mapping of the POF1 locus and identification of putative genes for premature ovarian failure, *Mol. Hum. Reprod.*, Vol.6, No.4, 314-318.

- DEAN, F.B., NELSON, J.R., GIESLER, T.L., LASKEN, R.S., 2001, Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification, *Genome Res.*, Vol.11, No.6, 1095-1099.
- DE BAERE, E., LEMERCIER, B., CHRISTIN-MAITRE, S., DURVAL, D., MESSIAEN, L., FELLOUS, M., VEITIA, R., 2002, FOXL2 mutation screening in a large panel of POF patients and XX males, *J. Med. Genet.*, Vol.39, No.8, e43.
- DE BAERE, E., BEYSEN, D., OLEY, C., LORENZ, B., COCQUET, J., DE SUTTER, P., DEVRIENT, K., DIXON, M., FELLOUS, M., FRYNS, J.P., GARZA, A., JONSRUD, C., KOIVISTO, P.A., KRAUSE, A., LEROY, B.P., MEIRE, F., PLOMP, A., VAN MALDERGEM, L., DE PAEPE, A., VEITIA, R., MESSIAEN, L., 2003, FOXL2 and BPES: mutational hotspots, phenotypic variability, and revision of the genotype-phenotype correlation, *Am. J. Hum. Genet.*, Vol. 72, No.2, 478-487.
- DECHANET, C., ANAHORY, T., MATHIEU DAUDE, J.C., QUANTIN, X., REYFTMANN, L., HAMAMAH, S., HEDON, B., DECHAUD, H., 2010, Effects of cigarette smoking on reproduction, *Human Reproduction Update*, Vol. 17, No.1, 76.
- DE VRIES, B.B., PFUNDT, R., LEISINK, M., KOOLEN, D.A., VISSERS, L.E., JANSSEN, I.M., REIJMERSDAL, S., NILLESEN, W.M., HUYS, E.H., LEEUW, N., SMEETS, D., SISTERMANS, E.A., FEUTH, T., VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C.M., VAN KESSEL, A.G., SCHOENMAKERS, E.F., BRUNNER, H.G., VELTMAN, J.A., 2005, Diagnostic genome profiling in mental retardation, *Am. J. Hum. Genet.*, Vol.77, No.4, 606-616.
- DIEHL, F., GRAHLMANN, S., BEIER, M., HOHEISEL, J.D., 2001, Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal, *Nucleic Acids Research*, Vol.29, No.7, 1-5.
- DI PASQUALE, E., BECK-PECCOZ, P., PERSANI, L., 2004, Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene, *Am. J. Hum. Genet.*, Vol.75, No.1, 106-111.
- DOLDI, N., BELVISI, L., BASSAN, M., FUSI, F.M., FERRARI, A., 1998, Premature ovarian failure: steroid synthesis and autoimmunity, *Gynecol Endocrinol*, Vol.12, No.1, 23-28.
- DONG, J., ALBERTINI, D., NISHIMORI, K., LU, N., MATZUK, M., 1996, Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis, *Nature* Vol.383, No.6600, 531-535.

- DORFMAN, D.M., GENEST, D.R., REIJO PERA, R.A., 1999, Human DAZL1 encodes a candidate fertility factor in women that localizes to the prenatal and postnatal germ cells, *Hum. Reprod.*, Vol.14, No.10, 2531-2536.
- DOWER, W.J., MILLER, J.F., RAGSDALE, C.W., 1988, High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucl. Acids Research*, Vol.16, No.13, 6127-6145.
- DRUMMOND, A.E., LE, M.T., ETHIER, J.F., DYSON, M., FINDLAY, J.K., 2002b, Expression and localisation of activin receptors, Smads and betaglycan to the postnatal rat ovary, *Endocrinology*, Vol.143, No.4, 1423-1433.
- DUNCAN, M., CUMMINGS, L., CHADA, K., 1993, Germ cell deficient (gcd) mouse as a model of premature ovarian failure, *Biol Reprod*, Vol.49, No.2, 221-227.
- DURMAZ, Ç.C., 2005, *Cerrahi menopozdaki hastalarda kullanılan çeşitli östrojen formlarının insülin sensitivitesi üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi I. Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği.
- ERTÜNGEALP, E., SEYİSOĞLU, H., 2000, Menopoz ve osteoporoz, *Ulusal menopoz ve Osteoporoz Derneği*, İstanbul, 28.
- ESTEBAN, J.A., SALAS, M., BLANCO, L., 1993, Fidelity of phi 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization, *J Biol Chem*, Vol.268, No.4, 2719-2726.
- FASSNACHT, W., MEMPEL, A., STROWITZKI, T., VOGT, P.H., 2006, Premature ovarian failure (POF) syndrome: towards the molecular clinical analysis of its genetic complexity, *Current Medicinal Chemistry*, Vol.13, No.12, 1397-1410.
- FAMILIARI, G.A., CAGGIATI, A., NOTTOLA, S.A., ERMINI, M., DI BENEDETTO, M.R., MOTTA, P.M., 1993, Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease, *Hum Reprod*, Vol.8, No.12, 2080-2087.
- FARE, T.L., COFFEY, E.M., DAI, H., HE, Y.D., KESSLER, D.A., KILIAN, K.A., KOCH, J.E., LEPROUST, E., MARTON, M.J., MEYER, M.R., STOUGHTON, R.B., TOKIWA, G.Y., WANG, Y., 2003, Effects of atmospheric ozone on microarray data quality, *Anal. Chem.*, Vol.75, No.17, 4672-4675.
- FAST, D. ve ABRAMS, L.J., 2006, *Summary of Fragile X Syndrome; Prevalence of fragile X syndrome* [online], <http://www.fragilex.org/html/summary.htm> [Ziyaret Tarihi: 15.05.2010].
- FEINBERG, A.P. ve VOGELSTEIN, B., 1983, A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, *Anal Biochem.*, Vol.132, No.1, 6-13.

- FEINBERG, A.P. ve VOGELSTEIN, B., 1984, A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, Addendum, *Anal Biochem.*, Vol.137, No.1, 266-267.
- FEUK, L., CARSON, A.R., SCHERER, S.W., 2006, Structural variation in the human genome, *Nat. Rev. Genet.*, Vol.7, 85-97.
- FIEGLER, H., REDON, R., CARTER, N.P., 2007, Construction and use of spotted large-insert clone DNA microarrays for the detection of genomic copy number changes, *Nature Protocols*, Vol.2, No.3, 577-587.
- FILICORI, M., BUTLER, J.P., CROWLEY, W.F., 1984, Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human, *J. Clin. Invest.*, Vol.73, 1638-1647.
- FINDLAY, J.K., 1993, An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis, *Biol. Reprod.*, Vol.48, No.1, 15-23.
- FINDLAY, J.K., DRUMMOND, A.E., DYSON, M.L., BAILLIE, A.J., ROBERTSON, D.M., ETHIER, J.F., 2002, Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily, *Mol. Cell. Endocrinol.*, Vol.191, No.1, 35-43.
- FITCH, N., DE SAINT VICTOR, J., RICHER, C.L., PINSKI, L., SITAHAL, S., 1982, Premature menopause due to a small deletion in the long arm of the X chromosome: a report of three cases and a review, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, Vol.142, No.8, 968-972.
- FLACH, J.E., REICHARDT, J.K.V., ELSAS, L.J.II., 1990, Sequence of a cDNA encoding human galactose-1-phosphate uridyl transferase, *Molec. Biol. Med.*, Vol.7, No.4, 365-369.
- FORGES, T. ve MONNIER-BARBARINO, P., 2003, Premature ovarian failure in galactosaemia: pathophysiology and clinical management, *Pathol Biol*, Paris, Vol.51, No.1, 47-56.
- FRASER, H.M. ve BOUCHARD, P., 1994, Control of the preovulatory luteinizing hormone surge by gonadotropin-releasing hormone antagonists prospects for clinical application, *Endocrinology & Metabolism*, Vol.5, No.2, 87-93.
- FREEMAN, J.L., PERRY, G.H., FEUK, L., REDON, R., MCCARROLL, S.A., ALTSHULER, D.M., ABURATANI, H., JONES, K.W., TYLER-SMITH, C., HURLES, M.E., CARTER, N.P., SCHERER, S.W., LEE, C., 2006, Copy number variation: new insights in genome diversity, *Genome Res.*, Vol.16, No.8, 949-961.
- FRENGEN, E., WEICHENHAN, D., ZHAO, B., OSOEGAWA, K., VAN GEEL, M., DE JONG, P.J., 1999, A modular, positive selection bacterial artificial chromosome vector with multiple cloning sites, *Genomics*, Vol.58, No.3, 250-253.

- FRIEDMAN, J.M., BAROSS, A., DELANEY, A.D., ALLY, A., ARBOUR, L., ARMSTRONG, L., ASANO, J., BAILEY, D.K., BARBER, S., BIRCH, P., BROWN-JOHN, M., CAO, M., CHAN, S., CHAREST, D.L., FARNOUD, N., FERNANDES, N., FLIBOTTE, S., GO, A., GIBSON, W.T., HOLT, R.A., JONES, S.J., KENNEDY, G.C., KRZYWINSKI, M., LANGLOIS, S., LI, H.I., MCGILLIVRAY, B.C., NAYAR, T., PUGH, T.J., RAJCAN-SEPAROVIC, E., SCHEIN, J.E., SCHNERCH, A., SIDDIQUI, A., VAN ALLEN, M.I., WILSON, G., YONG, S.L., ZAHIR, F., EYDOUX, P., MARRA, M.A., 2006, Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation, *Am. J. Hum. Genet.* Vol.79, No.3, 500-513.
- GALLARDO, T.D., JOHN, G.B., BRADSHAW, K., WELT, C., RENEE, R.P., VOGT, P.H., TOURAINE, P., BIONE, S., TONIOLO, D., NELSON, L.M., ZINN, A.R. and CASTRILLON, D.H., 2008, Sequence variation at the human FOXO3 locus: A study of premature ovarian failure and primary amenorrhea, *Hum Reprod.*, Vol.23, No.1, 216-221.
- GALLOWAY, S.M., MCNATTY, K.P., CAMBRIDGE, L.M., LAITINEN, M.P., JUENGEL, J.L., JOKIRANTA, T.S., MCLAREN, R.J., LUIRO, K., DODDS, K.G., MONTGOMERY, G.W., BEATTIE, A.E., DAVIS, G.H., RITVOS, O., 2000, Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner, *Nat. Genet.*, Vol.25, No.3, 279-283.
- GIOVANNUCCI UZIELLI, M.L., GUARDUCCI, S., LAPI, E., CECCONI, A., RICCI, U., RICOTTI, G., BIONDI, C., SCARSELLI, B., VIERI, F., SCARNATO, P., 1999, Premature ovarian failure (POF) and fragile X premutation females: from POF to fragile X carrier identification, from fragile X carrier diagnosis to POF association data, *Am J Med Genet*, Vol.84, 300-303.
- GOLABI, M. ve ROSEN, L., 1984, A new X-linked mental retardation-overgrowth syndrome, *Am. J. Med. Genet.*, Vol.17, No.1, 345-358.
- GOLDENBERG, R.L., GRODIN, R.L., RODBARD, D., ROSS, G.T., 1973, Gonadotropins in women with amenorrhea. The use of plasma follicle-stimulating hormone to differentiate women with and without ovarian follicles, *Am J Obstet Gynecol*, Vol.116, No.7, 1003-9.
- GRAY, G.D. ve WICKSTROM, E., 1997, Rapid measurement of modified oligonucleotide levels in plasma samples with a fluorophore specific for single-stranded DNA, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, Vol.7, No.3, 133-140.
- GROMOLL, J., PEKEL, E., NIESCHLAG, E., 1996, The structure and organization of the human follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene, *Genomics*, Vol.35, No.2, 308-311.
- GUERRERO, N.V., SINGH, R.H., MANATUNGA, A., BERRY, G.T., STEINER, R.D., ELSAS, L.J., 2000, Risk factors for premature ovarian failure in females with galactosemia, *J. Pediatr.*, Vol.137, No.6, 833-841.

- GÜNYELİ, İ., 2009, *Preamatür ovaryan yetmezlik (erken menopoza = POF)* [online], <http://www.medicalnetwork.com.tr/web/icindekiler.asp?goster=1&Sayi=24>, [Ziya_ret Tarihi: 4 Şubat 2010].
- HAGERMAN, R.J., HAGERMAN, P.J., 2002, The fragile X premutation: into the phenotypic fold, *Curr Opin Genet Dev.*, Vol.12, 278-283.
- HALVORSON, L.M. ve DECHERNEY, A.H., 1996, Inhibin, activin, and follistatin in reproductive medicine, *Fertil. Steril.*, Vol.65, No.3, 459 - 469.
- HILLION, J., LE CONIAT, M., JONVEAUX, P., BERGER, R., BERNARD, O.A., 1997, AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily, *Blood*, Vol.90, 3714-3719.
- HODGSON, G., HAGER, J.H., VOLIK, S., HARIONO, S., WERNICK, M., MOORE, D., NOWAK, N., ALBERTSON, D.G., PINKEL, D., COLLINS, C., HANAHAN, D., GRAY, J.W., 2001, Genome scanning with array CGH delineates regional alterations in mouse islet carcinomas, *Nat. Genet.*, Vol.29, No.4, 459-464.
- HU, D.G., WEBB, G. ve HUSSEY, N., 2004, Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization, *Molecular Human Reproduction*, Vol.10, No.4, 283-289.
- HUNDSCHIED, R.D., SISTERMANS, E.A., THOMAS, C.M., BRAAT, D.D., STRAATMAN, H., KIEMENEY, L.A., OOSTRA, B.A., SMITS, A.P., 2000, Imprinting effect in premature ovarian failure confined to paternally inherited fragile X premutations, *Am J Hum Genet*, Vol.66, 413-418.
- HUNG, L., 1991, A blue/white cloning assay for quality control of DNA restriction and modifying enzymes, *Promega Notes*, Vol.33, 12.
- HUNTRISS, J., HINKINS, M., PICTON, H.M., 2006, cDNA cloning and expression of the human NOBOX gene in oocytes and ovarian follicles, *Mol Hum Reprod*, Vol.12, No.5, 283-289.
- IRVINE, W.J., CHAN, M.M.W., SCARTH, L., KOLB, F.O., HARTOG, M., BAYLISS, R.I., DRURY, M.I., 1968, Immunological aspects of premature ovarian failure associated with idiopathic Addison's disease, *Lancet*, Vol.2, No.7574, 883-887.
- JEUKEN, J.W.M., SPRENGER, S.H.E. ve WESSELING, P., 2002, Comparative genomic hybridization: practical guideline, *Diagn. Mol. Pathol.*, Vol.11, No.4, 193-203.
- JOHNSTONE, O., DEURING, R., BOCK, R., LINDER, P., FULLER, M.T., LASKO, P., 2005, Belle is a Drosophila DEAD-box protein required for viability and in the germ line, *Dev. Biol.*, Vol.277, No.1, 92-101.

- JONES, M.H., FURLONG, R.A., BURLONG, H., CHALMERS, I.J., BROWN, G.M., KHWAJA, O., AFFARA, N.A., 1996, The *Drosophila* developmental gene *fat facets* has a human homologue in Xp11.4 which escapes X-inactivation and has related sequences on Yq11.2, *Hum. Mol. Genet.*, Vol.5, No.11, 1695-1701.
- JUENGEL, J.L., HUDSON, N.L., HEATH, D.A., SMITH, P., READER, K.L., LAWRENCE, S.B., O'CONNELL, A.R., LAITINEN, M.P., CRANFIELD, M., GROOME, N.P., RITVOS, O., MCNATTY, K.P., 2002, Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep, *Biol Reprod*, Vol.67, No.6, 1777-1789.
- JUENGEL, J.L. ve MCNATTY, K.P., 2005, The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development, *Hum. Reprod. Update*, Vol.11, No.2, 143-160.
- KALLIONIEMI, A., KALLIONIEMI, O.P., SUDAR, D., RUTOVITZ, D., GRAY, J.W., WALDMAN, F., PINKEL, D., 1992, Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors, *Science*, Vol.258, No.5083, 818-821.
- KATER, C.E. ve BIGLIERI, E.G., 1994, Disorders of steroid 17 alphahydroxylation deficiency, *Endocrinol Metab Clin North Am*, Vol.23, 341-357.
- KAUFMAN, F., KOGUT, M.D., DONNELL, G.N., KOCH, H., GOEBELSMANN, U., 1979, Ovarian failure in galactosaemia, *Lancet*, Vol.2, No.8145, 737-738.
- KOK, H.S., VAN ASSELT, K.M., VAN DER SCHOUW, Y.T., PEETERS, P.H., WIJMENGA, C., 2005, Genetic studies to identify genes underlying menopausal age, *Hum Reprod Update*; Vol.11, No.5, 483-493.
- KONDO, I., NAKAMURA, N., 1984, *Cytogenet. Cell. Genet.*, Vol.37, 514.
- KOYAMA, H., WADA, T., NISHIZAWA, Y., IWANAGA, T., AOKI, Y., 1977, Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer, *Cancer*, Vol.39, No.4, 1403-1409.
- KRAUSS, C.M., TURKSOY, R.N., ATKINS, L., MCLAUGHLIN, C., BROWN, L.G., PAGE, D.C., 1987, Familial premature ovarian failure due to an interstitial deletion of the long arm of the X chromosome, *N Engl J Med.*, Vol.317, 125-131.
- KRAUS, J., PANTEL, K., PINKEL, D., ALBERTSON, D.G., SPEICHER, M.R., 2003, High-resolution genomic profiling of occult micrometastatic tumor cells, *Genes Chromosomes Cancer*, Vol.36, 159-166.
- KUMAR, A., GHADIR, S., ESKANDARI, N., DECHERNEY, A.H., 2007, Current Diagnosis & Treatment Obstetrics & Gynecology, DeCherney A.H. and Nathan L. (ed.), McGraw-Hill, New York, *Infertility*, 917-925.

- LABARBERA, A.R., MILLER, M.M., OBER, C., REBAR, R.W., 1988, Autoimmune etiology in premature ovarian failure, *Am J Reprod Immunol Microbiol.*, Vol.16, No.3, 115-122.
- LAML, T., PREYER, O., UMEK, W., HENGSTSCHLAGER, M., HANZAL, H., 2002, Genetic disorders in premature ovarian failure, *Hum Reprod Update*, Vol.8, No.5, 4834-4891.
- LARSEN, E.C., MULLER, J., SCHMIEGELOW, K., RECHNITZER, C., ANDERSEN, A.N., 2003, Reduced ovarian function in longterm survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol.88, No.11, 5307-5314.
- LATRONICO, A.C., ANASTI, J.N., ARNHOLD, I.J.P., RAPAPORT, R., MENDONCA, B.B., BLOISE, W., CASTRO, M., TSIGOS, C., CHROUSOS, G.P., 1996, Brief report: Testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene, *N Engl J Med*, Vol.334, 507-512.
- LEE, J.A. ve LUPSKI, J.R., 2006, Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders, *Neuron*, Vol.52, 103-121.
- LEVY, H.L., DRISCOLL, S.G., PORENSKY, R.S., WENDER, D.F., 1984, Ovarian failure in Galactosemia, *N Engl J Med*, Vol.310, No.1, 50.
- LIN, H., HUBER, R., SCHLESSINGER, D., MORIN, P.G., 1999, Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines, *Cancer Res.*, Vol.59, No.4, 807-810.
- LIU, Y.X. ve HSUEH, A.J., 1986, Synergism between granulosa and theca-interstitial cells in estrogen biosynthesis by gonadotropin-treated rat ovaries: studies on the two-cell, two-gonadotropin hypothesis using steroid antisera, *Biol Reprod.*, Vol.35, No.1, 27-36.
- LIZARDI, P.M., HUANG, X., ZHU, Z., BRAY-WARD, P., THOMAS, D.C., WARD, D.C., 1998, Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification, *Nat Genet.*, Vol.19, No.3, 225-232.
- LUCITO, R., HEALY, J., ALEXANDER, J., REINER, A., ESPOSITO, D., CHI, M., RODGERS, L., BRADY, A., SEBAT, J., TROGE, J., WEST, J.A., ROSTAN, S., NGUYEN, K.C., POWERS, S., YE, K.Q., OLSHEN, A., VENKATRAMAN, E., NORTON, L., WIGLER, M., 2003, Representational oligonucleotide microarray analysis: A high-resolution method to detect genome copy number variation, *Genome Research*, Vol.13, No.10, 2291-2305.
- LUOMA, P., MELBERG, A., RINNE, J.O., KAUKONEN, J.A., NUPPONEN, N.N., CHALMERS, R.M., OLDFORS, A., RAUTAKORPI, I., PELTONEN, L., MAJAMAA, K., SOMER, H., SUOMALAINEN, A., 2004, Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study, *Lancet*, Vol.364, No.9437, 875-882.

- MACH, J.M. ve LEHMANN, R., 1997, An Egalitarian-BicaudalD complex is essential for oocyte specification and axis determination in *Drosophila*, *Genes Dev.*, Vol.11, No.4, 423-435.
- MANIATIS, T., SAMBROOK, J. ve FRITSCH, E.F., 1989, *in Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, Quantification of DNA and RNA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 0879693096, Vol.1, E-6.
- MAROZZI, A., MANFREDINI, E., GRAZIA TIBILETTI, M., FURLAN, D., VILLA, N., VEGETTI, W., CROSIGNANI, P.G., GINELLI, E., MENEVERI, R., DALPRÀ, L., 2000a, Molecular definition of Xq common-deleted region in patients affected by premature ovarian failure, *Hum. Genet.*, Vol.107, No.4, 304-311.
- MAROZZI, A., VEGETTI, W., MANFREDINI, E., TIBILETTI, M.G., TESTA, G., CROSIGNANI, P.G., GINELLI, E., MENEVERI, R., DALPRÀ, L., 2000b, Association between idiopathic premature ovarian failure and fragile X premutation, *Hum Reprod.*, Vol.15, No.1, 197-202.
- MASSAGUE', J., 1998, TGF- β signal transduction, *Annu. Rev. Biochem.*, Vol.67, 753-791.
- MATTHEWS, C.H., BORGATO, S., BECK-PECCOZ, P., ADAMS, M., TONE, Y., GAMBINO, G., CASAGRANDE, S., TEDESCHINI, G., BENEDETTI, A., CHATTERJEE, V.K., 1993, Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the subunit of follicle-stimulating hormone, *Nat Genet*, Vol.5, 83-86.
- MCGEE, E.A. ve HSUEH, A.J., 2000, Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles, *Endocr Rev*, Vol.21, 200-214.
- MCGRATH, S.A., ESQUELA, A.F. ve LEE, S.J., 1995, Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9, *Mol Endocrinol*, Vol.9, No.1, 131-136.
- MCNATTY, K.P., JUENGEL, J.L., WILSON, T., GALLOWAY, S.M., DAVIS, G.H., 2002, Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep, *Reprod. Fert. Dev.*, Submitted.
- MCNATTY, K.P., SMITH, P., MOORE, L.G., READER, K., LUN, S., HANRAHAN, J.P., GROOME, N.P., LAITINEN, M., RITVOS, O., JUENGEL, J.L., 2005, Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate, *Mol. Cell. Endocrinol.*, Vol.234, No.1-2, 57-66.
- MERCAN, R., 2005, *Prematür Ovarian Yetmezlik-Erken Menopoz*, <http://www.jineart.com/modules.php?name=News&file=article&sid=12> [Ziyaret Tarihi: 15 Temmuz 2010].
- MESKHI, A., SEIF, M.W., 2006, Prematüre Over Yetmezliği, *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology TÜRKÇE BASKI*, Vol.1, No.2, 101-113.

- MIGEON, B.R. ve JELALIAN, K., 1977, Evidence for two active X chromosomes in germ cells of female before meiotic entry, *Nature*, Vol.269, 242-243.
- MORISHIMA, A., GRUMBACH, M.M., SIMPSON, E.R., FSHER, C., QIN, K., 1995, Aromatase Deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol.80, No.12, 3689-98.
- MORRIS, I.D. ve SHALET, S.M., 1990, Protection of gonadal function from cytotoxic Chemotherapy and irradiation, *Bailieres Clin Endocrinol Metab*, Vol.4, No.1, 97-118.
- MULLER, J., 2002, Disturbance of pubertal development after cancer treatment, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, Vol.16, No.1, 91-103.
- MUMM, S., HERRERA, L., WAELTZ, P.W., SCARDOVI, A., NAGARAJA, R., ESPOSITO, T., SCHLESSINGER, D., ROCCHI, M., FORABOSCO, A., 2001, X/autosomal translocations in the Xq critical region associated with premature ovarian failure fall within and outside genes, *Genomics*, Vol.76, 30-36.
- MURRAY, A., 2000, Premature ovarian failure and the FMR1 gene, *Semin Reprod Med*; Vol.18, No.1, 59-66.
- MURRAY, A., ENNIS, S., MORTON, N., 2000b, No evidence for parent of origin influencing premature ovarian failure in fragile X premutation carriers, *Am J Hum Genet*, Vol.67, 253-258.
- NAGAMINE, K., PETERSON, P., SCOTT, H.S., KUDOH, J., MINOSHIMA, S., HEINO, M., KROHN, K.J.E., LALIOTI, M.D., MULLIS, P.E., ANTONARAKIS, S.E., KAWASAKI, K., ASAKAWA, S., ITO, F., SHIMIZU, N., 1997, Positional cloning of the APECED gene, *Nat. Genet.*, Vol.17, No.4, 393-398.
- NELSON, L.M., KIMZEY, L.M., MERRIAM, G.R., FLEISHER, T.A., 1991, Increased peripheral T lymphocyte activation in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure, *Fertil Steril*, Vol.55, No.6, 1082-1087.
- NELSON, L.M., ANASTI, J.N., KIMZEY, L.M., DEFENSOR, R.A., LIPETZ, K.J., WHITE, B.J., SHAWKER, T.H., MERINO, M.J., 1994, Development of luteinized graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol.79, No.5, 1470-1475.
- NELSON, L.M., ANASTI, J.N., FLACK, M.R., 1996, *Premature ovarian failure*, In: Adashi E.Y., Rock J.A., Rosenwaks Z. (ed.), *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology*, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1394-1410.

- NELSON, J.R., CAI, Y.C., GIESLER, T.L., FARCHAUS, J.W., SUNDARAM, S.T., ORTIZ-RIVERA, M., HOSTA, L.P., HEWITT, P.L., MAMONE, J.A., PALANIAPPAN, C., FULLER, C.W., 2002, TempliPhi , phi 29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing, *Biotechniques*, Vol.32, 44-47.
- NELSON, L.M., COVINGTON, S.N., REBAR, R.W., 2005, An update: spontaneous premature ovarian failure is not an early menopause, *Fertil Steril*, Vol.83, 1327-1332.
- NISHI, S., HOSHI, N., KASAHARA, M., ISHIBASHI, T., FUJIMOTO, S., 1999, Existence of human DAZLA protein in the cytoplasm of human oocytes, *Mol. Hum. Reprod.*, Vol.5, No.6, 495-497.
- NOLIN, S.L., LEWIS, F.A., YE, L.L., HOUCK, G.E., GLICKSMAN, A.E., LIMPRASERT, P., LI, S.Y., ZHONG, N., ASHLEY, A.E., FEINGOLD, E., SHERMAN, S.L., BROWN, W.T., 1996, Familial transmission of the FMR1 CGG repeat, *Am J Hum Genet*, Vol.59, No.6, 1252-1261.
- NICHD, National Institute of Health National Institute of Child Health, and Human Development., <http://www.nichd.nih.gov/publications/pubs/fragileX/sub12.htm> (Last Modified: 05/05/2004).
- O'DONNELL, W.T., WARREN, S.T., 2002, A decade of molecular studies of fragile X syndrome, *Annu. Rev. Neurosci.*, Vol.25, 315-338.
- OBERLE, I., ROUSSEAU, F., HEITZ, D., KRETZ, C., DEVYS, D., HANAUER, A., BOUE, J., BERTHEAS, M., MANDEL, J., 1991, Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome, *Science*, Vol.252, 1097-1102.
- OHTA, H., SUGIMOTO, I., MASUDA, A., KOMUKAI, S., SUDA, Y., MAKITA, K., TAKAMATSU, K., HORIGUCHI, F., NOZAWA, S., 1996, Decreased bone mineral density associated with early menopause progresses for at least ten years: Cross-sectional comparisons between early and normal menopausal women, *Bone*, Vol.18, No.3, 227-231.
- OKTAY, K., ECONOMOS, K., KAN, M., RUCINSKI, J., VEECK, L., ROSENWAKS, Z., 2001, Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm, *JAMA*, Vol.286, No.12, 1490-1493.
- OLD, R., MURRAY, K. ve BOIZES, G., 1975, Recognition sequence of restriction endonuclease III from *Hemophilus influenzae*, *J. Mol. Biol.*, Vol.92, 331-339.
- OLSEN, L.C., AASLAND, R., FJOSE, A., 1997, A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells, *Mech. Dev.*, Vol.66, 95-105.

- OTSUKA, F., YAO, Z., LEE, T., YAMAMOTO, S., ERICKSON, G.F., SHIMASAKI, S., 2000, Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions, *J. Biol. Chem.*, Vol.275, No.50, 39523-39528.
- OTSUKA, F., YAMAMOTO, S., ERICKSON, G.F., SHIMASAKI, S. 2001b., Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression, *J. Biol. Chem.*, Vol.276, No.14, 11387-11392.
- PAN, H.A., TSAI, S.J., CHEN, C.W., LEE, Y.C., LIN, Y.M., KUO, P.L., 2002, Expression of DAZL protein in the human corpus luteum, *Mol. Hum. Reprod.*, Vol.8, No.6, 540-545.
- PANGAS, S.A. ve RAJKOVIC, A., 2006, Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters, *Hum Reprod Update*, Vol.12, No.1, 65–76.
- PARK, S.H., LEE, S.G., KIM, Y., SONG, K., 1998, Assignment of a human putative RNA helicase gene, DDX3, to human X chromosome bands p11.3-->p11.23, *Cytogenet. Cell. Genet.*, Vol.81, No.3-4, 178-179.
- PECCOZ, B.P. ve PERSANI, L., 2006, Premature ovarian failure, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, Vol.1, No.9, 1-5.
- PENG, C., OHNO, T., KOH, L.Y., CHEN, V.T.S., LEUNG, P.C.K., 1999, Human ovary and placenta express messenger RNA for multiple activin receptors, *Life Sci.*, Vol.64, 983-994.
- PHILIPPE, C., CREMERS, F.P.M., CHERY, M., BACH, I., ABBADI, N., ROPERS, H.H., GILGENKRANTZ, S., 1993, Physical mapping of DNA markers in the q13-q22 region of the human X chromosome, *Genomics*, Vol.17, No.1, 147–152.
- PIERETTI, M., ZHANG, F.P., FU, Y.H., WARREN, S.T., OOSTRA, B.A., CASKEY, C.T., NELSON, D.L., 1991, Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome, *Cell*, Vol.66, 817-822.
- PILIA, G., HUGHES-BENZIE, R.M., MACKENZIE, A., BAYBAYAN, P., CHEN, E.Y., HUBER, R., NERI, G., CAO, A., FORABOSCO, A., SCHLESSINGER, D., 1996, Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, *Nature Genet.*, Vol.12, No.3, 241-247.
- PINKEL, D., SEGRAVES, R., SUDAR, D., CLARK, S., POOLE, I., KOWBEL, D., COLLINS, C., KUO, W.L., CHEN, C., ZHAI, Y., DAIRKEE, S.H., LJUNG, B.M., GRAY, J.W., ALBERTSON, D.G., 1998, High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays, *Nat Genet*, Vol.20, No.2, 207-211.

- PORTNOI, M.F., ABOURA, A., TACHDJIAN, G., BOUCHARD, P., DEWAILLY, D., BOURCIGAUX, N., FRYDMAN, R., REYSS, A.C., BRISSET, S., CHRISTIN-MAITRE, S., 2006, Molecular cytogenetic studies of Xq critical regions in premature ovarian failure patients, *Human Reproduction*, Vol.21, No.9, 2329–2334.
- POWELL, C.M., TAGGART, R.T., DRUMHELLER, T.C., WANGSA, D., QIAN, C., NELSON, L.M., WHITE, B.J., 1994, Molecular and cytogenetic studies of an X; autosome translocation in a patient with premature ovarian failure and review of the literature, *Am J Med Genet*, Vol.52, No.1, 19-26.
- PRESTOZ, L.L., COUTO, A.S., SHIN, Y.S., PETRY, K.G., 1997, Altered follicle stimulating hormone Isoforms in female galactosaemia patients, *Eur J Pediatr*, Vol.156, No.2, 116-20.
- PROOIJEN-KNEGT, A.C., VAN HOEK, J.F., BAUMAN, J.G., VAN DUIJN, P., WOOL, I.G., VAN DER, P.M., 1982, In situ hybridization of DNA sequences in human metaphase chromosomes visualized by an indirect fluorescent immunocytochemical procedure, *Exp Cell Res*, Vol.141, No.2, 397-407.
- PRUEITT, R.L. ve ZINN, A.R., 2001, A fork in the road to fertility, *Nature Genet.*, Vol.27, No.2, 132-134.
- PRUEITT, R.L., CHEN, H., BARNES, R.I., ZINN, A.R., 2002, Most X;autosome translocations associated with premature ovarian failure do not interrupt X-linked genes, *Cytogenet. Genome Res.*, Vol.97, No.1-2, 32-38.
- RABINOVICI, J., BLANKSTEIN, J., GOLDMAN, B., RUDAK, E., DOR, Y., PARIENTE, C., GEIER, A., LUNENFELD, B., MASHIACH, S., 1989, In Vitro fertilization and primary embryonic cleavage are possible in 17 α -hydroxylase deficiency despite extremely low intrafollicular 17 β -estradiol, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol.68, No.3, 693-7.
- RALEIGH, E.A., MURRAY, N.E., REVEL, H., BLUMENTHAL, R.M., WESTAWAY, D., REITH, A.D., RIGBY, P.W., ELHAI, J., HANAHAN, D., 1988, McrA and McrB restriction phenotypes of some E. coli strains and implications for gene cloning, *Nucl. Acids Research*, Vol.16, No.4, 1563-1575.
- REBAR, R.W., CONNOLLY, H.V., 1990, Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea, *Fertil Steril*, Vol.53, No.5, 804-10.
- REBAR, R.W. ve CEDARS, M.I., 1992, Hypergonadotropic forms of amenorrhea in young women, *Endocrinol Metab Clin North Am*, Vol.21, 173-191.
- REYDERMAN, L. ve STAVCHANSKY, S., 1996, Determination of single-stranded oligodeoxynucleotides by capillary gel electrophoresis with laser induced fluorescence and on column derivatization, *J Chromatogr A*, Vol.755, No.2, 271-280.

- RICHARDS, J.A., 2001, Perspective: the ovarian follicle--a perspective in 2001, *Endocrinology*, Vol.142, No.6, 2184-2193.
- RICHARDSON, S.J., SENIKAS, V., NELSON, J.F., 1987, Follicular depletion during the menopausal transition: Evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol.65, No.6, 1231-1237.
- RIVA, P., MAGNANI, I., FUHRMANN CONTI, A.M., GELLI, D., SALA, C., TONIOLO, D., LARIZZA, L., 1996, FISH characterization of the Xq21 breakpoint in a translocation carrier with premature ovarian failure, *Clin. Genet.*, Vol.50, No.4, 267-269.
- ROCAK, S., LINDER, P., 2004, DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, Vol.5, No.3, 232-241.
- ROUSSEAU, F., HEITZ, D., BIANCALANA, V., BLUMENFELD, S., KRETZ, C., BOUE, J., TOMMERUP, N., VAN DER HAGEN, C., DELOZIER-BLANCHET, C., CROQUETTE, M.F., 1991, Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation, *N Engl J Med*, Vol.325, 1673-1681.
- RUGGIU, M., SPEED, R., TAGGART, M., MCKAY, S.J., KILJANOWSKI, F., SAUNDERS, P., DORIN, J., COOKE, H.J., 1997, The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis, *Nature*, Vol.389, No.6646, 73-77.
- RUSSELL, P., BANNATYNE, P., SHEARMAN, R.P., FRASER, I.S., CORBETT, P., 1982, Premature hypergonadotropic ovarian failure: clinicopathological study of 19 cases, *Int J Gynecol Pathol*, Vol.1, 185-201.
- SALA, C., ARRIGO, G., TORRI, G., MARTINAZZI, F., RIVA, P., LARIZZA, L., PHILIPPE, C., JONVEAUX, P., SLOAN, F., LABELLA, T., TONIOLO, D., 1997, Eleven X chromosome breakpoints associated with premature ovarian failure (POF) map to 15-Mb YAC contig spanning Xg21, *Genomics*, Vol.40, No.1, 123-131.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. ve MANIATIS, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANTORO, N., 2003, Mechanisms of premature ovarian failure, *Ann Endocrinol* Vol.64, 87-92.
- SARTO, G.E., 1974, Cytogenetics of fifty patients with primary amenorrhea, *Am J Obstet Gynecol*, Vol.119, No.1, 14-23.
- SCHERER, S.W., LEE, C., BIRNEY, E., ALTSHULER, D.M., EICHLER, E.E., CARTER, N.P., HURLES, M.E., FEUK, L., 2007, Challenges and standards in integrating surveys of structural variation, *Nat. Genet.*, Vol.39, 7-15.

- SCHMIDT, M. ve DU SART, D., 1992, Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-autosome translocations: a review of 122 cases, *Am J Med Genet.*, Vol.42, No.2, 161-169.
- SCHUCK, A., HAMELMANN, V., BRÄMSWIG, J.H., KONEMANN, S., RUBE, C., HESSELMANN, S., RIESENBECK, D., HORST, E., BOLLING, T., PAULUSSEN, M., JURGENS, H., WILLICH, N., 2005, Ovarian function following pelvic irradiation in prepubertal and pubertal girls and young adult women, *Strahlenther Onkol*, Vol.181, No.8, 534-539.
- SCHWARTZ, C.E., DEAN, J., HOWARD-PEEBLES, P.N., BUGGE, M., MIKKELSEN, M., TOMMERUP, N., HULL, C., HAGERMAN, R., HOLDEN, J.J., STEVENSON, R.E., 1994, Obstetrical and gynecological complications in fragile X carriers: a multicenter study, *Am J Med Genet*, Vol.51, 400-402.
- SEN, J., GOLTZ, J.S., STEVENS, L., STEIN, D., 1998, Spatially restricted expression of pipe in the Drosophila egg chamber defines embryonic dorsal-ventral polarity, *Cell*, Vol.95, No.4, 471-481.
- SHAFFER, L.G. ve BEJJANI, B.A., 2004, A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays, *Human Reproduction Update*, Vol.10, No.3, 221-226.
- SHAW-SMITH, C., REDON, R., RICHMAN, L., RIO, M., WILLATT, L., FIEGLER, H., FIRTH, H., SANLAVILLE, D., WINTER, R., COLLEUX, L., BOBROW, M., CARTNER, N., 2004, Microarray based comparative genomic hybridization (array-CGH) detect submicroscopic chromosomal deletions and duplication in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features, *J Med Genet*, Vol.41, No.4, 241-248.
- SHELLING, A.N., BURTON, K.A., CHAND, A.L., VAN EE, C.C., FRANCE, J.T., FARQUHAR, C.M., MILSOM, S.R., LOVE, D.R., GERSAK, K., AITOMÄKI, K., WINSHIP, I.M., 2000, Inhibin: a candidate gene for premature ovarian failure, *Hum. Reprod.*, Vol.15, No.12, 2644-2649.
- SHEN, T., SONODA, G., HAMID, J., LI, M., FILMUS, J., BUICK, R.N., TESTA, J.R., 1997, Mapping of the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome gene (GPC3) to chromosome X in human and rat by fluorescence in situ hybridization, *Mammalian Genome*, Vol.8, 72.
- SHERMAN, S.L., 2000, Premature ovarian failure among fragile X premutation carriers: parent-of-origin effect?, *Am. J. Hum. Genet.*, Vol.67, No.1, 11-13.
- SHERMAN, S., 2002, *Epidemiology*, In *Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment and Research*, 3rd ed, Hagerman R.J., Hagerman P.J. (ed.), MD: The Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp.136-168.

- SHIINA, H., MATSUMOTO, T., SATO, T., IGARASHI, K., MIYAMOTO, J., TAKEMASA, S., SAKARI, M., TAKADA, I., NAKAMURA, T., METZGER, D., CHAMBON, P., KANNO, J., YOSHIKAWA, H., KATO, S., 2006, Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice, *Proc Natl Acad Sci*, Vol.103, No.1, 224–229.
- SIDIS, Y., FUJIWARA, T., LEYKIN, L., ISAACSON, K., TOTH, T., SCHNEYER, A.L., 1998, Characterisation of inhibin/activin subunit, activin receptor and follistatin messenger ribonucleic acid in human and mouse oocytes: evidence for activin's paracrine signalling from granulosa cells to oocyte, *Biol. Reprod.*, Vol.59, 807-812.
- SIMPSON, J.L., CHRISTAKOS, A.C., HORWITH, M., SILVERMAN, F.S., 1971, Gonadal dysgenesis in individuals with apparently normal chromosomal complements: Tabulation of cases and compilation of genetic data, *Birth Defects*, Vol.7, 215- 228.
- SIMPSON, J.L., LANDEY, S., NEW, M., GERMAN, J., 1975, A previously unrecognized X-linked syndrome of dysmorphia, *Birth Defects Orig. Artic. Ser.*, Vol.11, 18-24.
- SINGH, R.P. ve CARR, D.H., 1966, The anatomy and histology of XO human embryos and fetuses, *Anat Rec*, Vol.155, No.3, 369-384.
- SNIJDERS, A.M., NOWAK, N., SEGRAVES, R., BLACKWOOD, S., BROWN, N., CONROY, J., HAMILTON, G., HINDLE, A.K., HUEY, B., KIMURA, K., LAW, S., MYAMBO, K., PALMER, J., YLSTRA, B., YUE, J.P., GRAY, J.W., JAIN, A.N., PINKEL, D., ALBERTSON, D.G., 2001, Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number, *Nat. Genet.*, Vol.29, 263-264.
- SULLIVAN, A.K., MARCUS, M., EPSTEIN, M.P., ALLEN, E.G., ANIDO, A.E., PAQUIN, J.J., YADAV-SHAH, M., SHERMAN, S.L., 2005, Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction, *Hum. Reprod.*, Vol.20, No.2, 402-412.
- SUNDBLAD, V., CHIAUZZI, V.A., ESCOBAR, M.E., DAIN, L., CHARREAU, E.H., 2004, Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure, *Mol Cell Endocrinol*, Vol.30, 1-2.
- SUZUMORI, N., YAN, C., MATZUK, M.M., RAJKOVIC, A., 2002, Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes, *Mech Dev*, Vol.111, No.1-2, 137–141.
- SYBERT, V.P. ve MCCAULEY, E., 2004, Turner's syndrome, *N. Engl. J. Med.*, Vol.351, No:12, 1227-1238.

- TACHDJIAN, G., ABOURA, A., PORTNOÏ, M.F., PASQUIER, M., BOURCIGAUX, N., SIMON, T., ROUSSEAU, G., FINKEL, L., BENKHALIFA, M., CHRISTIN-MAITRE, S., 2008, Cryptic Xp duplication including the SHOX gene in a woman with 46,X, del(X)(q21.31) and premature ovarian failure., *Hum Reprod.*, Vol.23, No.1, 222-226.
- TASSONE, F., HAGERMAN, R.J., IKLE, D., DYER, P.N., LAMPE, M., WILLEMSSEN, R., OOSTRA, B.A., TAYLOR, A.K., 1999, FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile X syndrome, *Am J Med Genet*, Vol.84, 250-261.
- TASSONE, F., HAGERMAN, R.J., TAYLOR, A.K., GANE, L.W., GODFREY, T.E., HAGERMAN, P.J., 2000b, Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in fragile X syndrome, *Am J Hum Genet*, Vol.66, 6-15.
- TELENIUS, H., CARTER, N.P., BEBB, C.E., NORDENSKJOLD, M., PONDER, B.A., TUNNACLIFFE, A., 1992, Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer, *Genomics*, Vol.13, No.3, 718-725.
- THARAPPEL, A.T., ANDERSON, K.P., SIMPSON, J.L., MARTENS, P.R., WILROY, R.S. JR., LLERENA, J.C. JR., SCHWARTZ, C.E., 1993, Deletion (X)(q26.1--> q28) in a proband and her mother: molecular characterization and phenotypic-karyotypic deductions, *Am. J. Hum. Genet.*, Vol.52, No.3, 463-471.
- THEISEN, A., 2008, Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH), *Nature Education*, Vol.1, 1.
- THERMAN, E., LAXOVA, R., SUSMAN, B., 1990, The critical region on the human Xq, *Hum Genet*, Vol.85, No.5, 455-461.
- THIBAUD, E., RAMIREZ, M., BRAUNER, R., FLAMANT, F., ZUCKER, J.M., FEKETE, C., RAPPAPORT, R., 1992, Preservation of ovarian function by ovarian transposition performed before pelvic irradiation during childhood, *J Pediatr*, Vol.121, No.6, 880-884.
- TILLY, J.L., 2001, Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive, *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol.2, 838-848.
- TIMMRECK, L.S., REINDOLLAR, R.H., 2003, Contemporary issues in primary amenorrhea, *Obstet Gynecol Clin North Am*, Vol.30, No.2, 287-302.
- TOLEDO, S.P., BRUNNER, H.G., KRAAIJ, R., POST, M., DAHIA, P.L., HAYASHIDA, C.Y., KREMER H. THEMME, A.P., 1996, An inactivating mutation of the luteinizing hormone receptor causes amenorrhea in a 46,XX female, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol.81, No.11, 3850-3854.

- TORGERSON, D.J., THOMAS, R.E., REID, D.M., 1997, Mothers and daughters menopausal ages: is there a link?, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, Vol.74., No.1, 63-66.
- TRASK, B.J., 2002, Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting, *Nat. Rev. Genet.*, Vol.3, No.10, 769-778.
- TSONIS, C.G., MCNEILLY, A.S., BAIRD, D.T., 1986, Measurement of exogenous and endogenous inhibin in sheep serum using a new and extremely sensitive bioassay for inhibin based on inhibition of ovine pituitary FSH secretion *in vitro*, *Journal of Endocrinology*, Vol.110, 341-352.
- UCHIDA, D., HATAKEYAMA, S., MATSUSHIMA, A., HAN, H., ISHIDO, S., HOTTA, H., KUDOH, J., SHIMIZU, N., DOUCAS, V., NAKAYAMA, K.I., KURODA, N., MATSUMOTO, M., 2004, AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase, *J. Exp. Med.*, Vol.199, No.2, 167-172.
- VAN DEN HURK, R. ve ZHAO, J., 2005, Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles, *Theriogenology*, Vol.63, No.6, 1717-1751.
- VAN KASTEREN, Y.M., SCHOEMAKER, J., 1999, Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy, *Hum Reprod Update*, Vol.5, 483-492.
- VELTMAN, J.A., SCHOENMAKERS, E.F.P.M., EUSSEN, B.H., JANSSEN, I., MERKX, G., VAN CLEEF, B., VAN RAVENSWAAIJ, C.M., BRUNNER, H.G., SMEETS, D., VAN KESSEL, A.G., 2002, High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization, *Am. J. Hum. Genet.*, Vol.70, No.5, 1269-1276.
- VENEMAN, T.F., BEVERSTOCK, G.C., EXALTO, N., MOLLEVANGER, P., 1991, Premature menopause because of an inherited deletion in the long arm of the X chromosome, *Fertil. Steril.*, Vol.55, 631-633.
- VERKERK, A.J., PIERETTI, M., SUTCLIFFE, J.S., FU, Y.H., KUHL, D.P., PIZZUTI, A., REINER, O., RICHARDS, S., VICTORIA, M.F., ZHANG, F.P., 1991, Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome, *Cell*, Vol.65, 905-914.
- VIANNA-MORGANTE, A.M., COSTA, S.S., 2000, Premature ovarian failure is associated with maternally and paternally inherited premutation in Brazilian families with fragile X, *Am J Hum Genet*, Vol.67, 254-258.
- VITT, U.A., HAYASHI, M., KLEIN, C., HSUEH, A.J.W., 2000, Growth differentiation factor 9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cell from small antral and preovulatory rat follicles, *Biol. Reprod.*, Vol.62, No.2, 370-377.

- WAGGONER, D.D., BUIST, N.R.M., DONNELL, G.N., 1990, Long-term prognosis in Galactosamia: results of a survey of 350 cases, *J Inherit Metab Dis*, Vol.13, No.6, 802-818.
- WALLACE, W.H.B., THOMSON, A.B., SARAN, F., KELSEY, T.W., 2005, Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, Vol.62, No.3, 738-744.
- WANG, J. ve ROY, S.K., 2004, Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone, *Biol Reprod*, Vol.70, No.3, 577-585.
- WEISMAN-SHOMER, P., COHEN, E., FRY, M., 2000, Interruption of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)(n) by interspersed d(AGG) trinucleotides diminishes the formation and stability of d(CGG)(n) tetrahelical structures, *Nucleic Acids Res*, Vol.28, 1535-1541.
- WEISS, M.M., HERMSEN, M.A., MEIJER, G.A., VAN GRIEKEN, N.C., BAAK, J.P., KUIPERS, E.J., VAN DIEST, P.J., 1999, Comparative genomic hybridisation, *Mol Pathol*, Vol.52, No.5, 243-251.
- WHEATCROFT, N. ve WEETMAN, A.P., 1997, Is premature ovarian failure an autoimmune disease?, *Autoimmunity*, Vol.25, No.3, 157-165.
- WILHELM, M., VELTMAN, J.A., OLSHEN, A.B., JAIN, A.N., MOORE, D.H., PRESTI, J.C., KOVACS, G., WALDMAN, F.M., 2002, Array-based comparative genomic hybridization for the differential diagnosis of renal cell cancer, *Cancer Res.*, Vol.62, No.4, 957-960.
- WOODCOCK, D.M., CROWTHER, P.J., DOHERTY, J., JEFFERSON, S., DECRUZ, E., NOYER-WEIDNER, M., SMITH, S.S., MICHAEL, M.Z., GRAHAM, M.W., 1989, Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants, *Nucl. Acids Research*, Vol.17, No.9, 3469-3478.
- WOODRUFF, T.K., KRUMMEN, L., MCCRAY, G., MATHER, J.P., 1993, In situ ligand binding of recombinant human activin A and recombinant human inhibin-A to the adult rat ovary, *Endocrinology*, Vol.133, 2998-3006.
- YANASE, T., SANDERS, D., SHIBATA, A., MATUSI, N., SIMPSON, E.R., WATERMAN, M.R., 1990, Combined 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase deficiency due to a 7-basepair duplication in the N-terminal region of the cytochrome P 450, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol.70, No.5, 1325-31.
- YEN, P.H., 2004, Putative biological functions of the DAZ family, *Int. J. Androl.*, Vol.27, No.3, 125-129.

- YI, S.E., LAPOLT, P.S., YOON, B.S., CHEN, J.Y.C., LU, J.K.H., LYONS, K.M., 2001, The type 1 BMP receptor Bmpr1B is essential for female reproductive function, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol.98, No.14, 7994-7999.
- YILDIRIM, A., 1996, *Menopozda oluşan fizyolojik değişiklikler*, Hikmet Hassa, Klinikte menopoz, Gestet Basımevi, Eskişehir, 1-13.
- YU, W., BALLIF, B.C., KASHORK, C.D., HEILSTEDT, H.A., HOWARD, L.A., CAI, W.W., WHITE, L.D., LIU, W., BEAUDET, A.L., BEJJANI, B.A., SHAW, C.A., SHAFFER, L.G., 2003, Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions, *Hum. Mol. Genet.*, Vol.12, 2145-2152.
- ZACHMANN, M., 1995, Defects in steroidogenic enzymes: Discrepancies between clinical steroid research and molecular biology results, *J Steroid Biochem Mol Biol*, Vol.53, 159-164.
- ZAFEIRIOU, S., LOUTRADIS, D., MICHALAS, S., 2000, The role of gonadotropins in follicular development and their use in ovulation induction protocols for assisted reproduction, *Eur J Contracept Reprod Health Care*, Vol.5, No.2, 157-167.
- ZUCKERMAN, S., 1951, The number of oocytes in the mature ovary, *Recent Prog. Horm. Res.*, Vol.6, 63-108.
- ZUCKERMAN, S. ve BAKER, T.G., 1977, *The development of the ovary and the process of oogenesis*, In *The Ovary*, S. Zuckerman and B.J. Weir, (eds.), New York: Academic Press, pp. 41-67.

ÖZGEÇMİŞ

23 Mayıs 1984 tarihinde İstanbul'da doğdum. 2002 yılında Bahçelievler Süper Lisesi'nden (Yabancı Dil Ağırlıklı) mezun oldum. 2003 yılında kayıt yaptırdığım İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi'nden; 2006 eğitim-öğretim yılı Bahar dönemini Sokrates-ERASMUS öğrenci değişim programı çerçevesinde kabul edildiğim Hollanda, Rijksuniversiteit Groningen'de Matematik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nü başarıyla tamamladıktan sonra, 2007 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Fakülte üçüncülüğü ve Bölüm birinciliği derecesiyle mezun oldum. Aynı yıl içerisinde İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans programına kabul edildim. Yüksek Lisans eğitimim sırasında Üniversite-Sanayi işbirliği çerçevesinde Medimiks Medikal Hizm. Biyoteknoloji Ar-Ge/Üretim Laboratuvarları bünyesinde TÜBİTAK-TEYDEB ve EUREKA desteği almış projelerde Araştırma Görevlisi olarak görev aldım. Medimiks Medikal Biyoteknoloji Ar-Ge/Üretim Laboratuvar'ında AR-GE ve Moleküler Genetik Ürün Sorumlusu olarak görevimi sürdürmekteyim.

Candan EKER
Moleküler Biyolog
candan_eker@hotmail.com