

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**46,XY KROMOZOM KURULUŞLU CİNSEL GELİŞİM
BOZUKLUĞU GÖSTEREN BİREYLERDE ANDROJEN
RESEPTÖR GEN DEĞİŞİKLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Vehap TOPÇU

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ**

**ANKARA
2011**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**46,XY KROMOZOM KURULUŞLU CİNSEL GELİŞİM
BOZUKLUĞU GÖSTEREN BİREYLERDE ANDROJEN
RESEPTÖR GEN DEĞİŞİKLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Vehap TOPÇU

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü BAP Koordinasyon Birimi
Koordinatörlüğü tarafından, 10B3330032 kod numarasıyla
desteklenmiştir**

ANKARA

2011

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Dahili Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

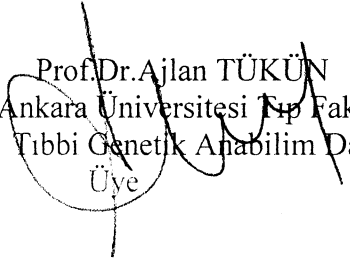
“46.XY Kromozom Kuruluşlu Cinsel Gelişim Bozukluğu Gösteren Bireylerde Androjen Reseptör Gen Değişikliklerinin Araştırılması” başlıklı Dr. Vehap Topçu’ya ait tez çalışması, aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi olarak** kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25.10.2011

Prof.Dr. Hatice Ilgın Ruhi
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı/Tez Danışmanı



Prof.Dr.Ajlan TÜKÜN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Üye



Yrd.Doç.Dr.Halil G.Karabulut
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Üye



ÖNSÖZ

Androjen duyarsızlık sendromları erkek cinsiyet gelişim bozukluğuna neden olan en sık genetik hastalıktır. Klinik olarak özellikle 5 α -redüktaz tip II enzim eksikliği ile ayırıcı tanı yapılması gerekmektedir; ancak benzer klinik tabloya neden olabilen farklı genlerle ilişkili mutasyonların varlığı da söz konusudur. Bu nedenle, androjen duyarsızlık sendromunda kesin tanı koyabilmek için moleküler genetik çalışma yapılmasının gerekliliği bu teze konu olmuştur.

Tıbbi genetik eğitimimi, ülkemizde önde gelen kuruluşlardan biri olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda tamamlamış olmaktan sonsuz mutluluk duymaktayım. Başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Hatice I. Ruhi'ye, Prof Dr. F. Ajlan Tükün'e, Yrd. Doç. Dr. Timur Tuncalı'ya, Yrd. Doç. Dr. Halil G. Karabulut'a ve Yrd. Doç. Dr. Nüket Y. Kutlay'a eğitimimdeki kıymetli katkılarından ötürü sonsuz minnet duymaktayım.

Proje yürütücüsü ve tez danışmanım olan Prof. Dr. Hatice I. Ruhi'ye ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Halil G. Karabulut'a teşekkürlerimi sunarım. Hasta örneklerinin toplanmasında ve çocuk endokrinolojisi rotasyonu sırasında eğitimime kıymetli katkılarından dolayı, yardımcı araştırmacılar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Endokrinolojisi ve Metabolizma Bilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Gönül Öçal'a, Prof. Dr. Merih Berberoğlu'na, Prof. Dr. Zeynep Şıklar'a ve Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anadalı, Çocuk Endokrinolojisi Kliniği, Klinik Şefi Doç. Dr. Zehra Aycan'a;

Çalışma boyunca samimi desteğini esirgemeyen Tuğrul Sutay ve Efsun Eren'e;

Çalışma arkadaşlarım Dr. Arzu Vicdan, Dr. Kenan Delil, Dr. Cemal Ekici, Dr. Sevgi Başer, Dr. Sadiye Ekinci ve Dr. Burak Mutlu'ya ve bana her konuda destek olan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nın tüm değerli çalışanlarına;

Bu tez, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü tarafından, 10B3330032 kod numarasıyla desteklenmiştir, emeği geçen tüm çalışanlarına;

Başımın tacı, sınırsız fedakarlıklarını bugüne kadar hiç esirgemeyen sevgili anneme, babama ve kardeşlerime;

Canımdan çok sevdiğim hayat arkadaşım ve sevgili eşim Ayşe'ye ve biricik oğlumuz Ömer'e

Saygı dolu, içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Vehap Topçu

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
Önsöz	ii
İçindekiler	iii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller Dizini	vii
Tablolar Dizini	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Genital Sistem Embriyolojisi	3
2.1.1 Testis Gelişimi	4
2.1.2 Genital Kanalların Farklılaşması	6
2.1.3 Testislerin İnişi	7
2.1.4 Erkeklerde Dış Genital Yapı	8
2.2 Androjen Reseptörü	9
2.2.1 Androjen Reseptör Yapısı	9
2.2.2 Androjen Reseptör Fizyolojisi ve Reseptörün Genom Üzerindeki Aktivitesi	11
2.3 Androjen Reseptör Gen Mutasyonları ve Fenotipik Değişkenlik	14
2.3.1 Glutamin ve Glisin Tekrar Polimorfizmleri	17
2.4 Androjen Duyarsızlık Sendromu	17
2.4.1 Komplet Androjen Duyarsızlık Sendromu	18
2.4.2 Parsiyel Androjen Duyarsızlık Sendromu	19
2.4.3 Hafif Androjen Duyarsızlık Sendromu	19
2.5 Androjen Duyarsızlık Sendromunda Fonksiyonel Özelliklerin Belirlenmesi	20
2.5.1 Genital Doku Hücrelerinde Androjen Reseptör Fonksiyonu	20
2.5.2 İn Vitro Transaktivasyon Testleri	21
2.5.3. N/C Etkileşim Testleri	21
2.6 Androjen Duyarsızlık Sendromunda Laboratuvar Bulguları	23
2.6.1 İlk 3 ay	23
2.6.2 Prepubertal Dönem	24
2.6.3 Pubertal Dönem	25
2.7 Androjen Duyarsızlık Sendromunda Ayırıcı Tanı	25
2.8 Androjen Duyarsızlık Sendromunda Prenatal Tanı	26
2.9 Androjen Duyarsızlık Sendromunda Tedavi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1 Olgular	29
3.2 Yöntem	36

3.2.1 Kullanılan Cihazlar	36
3.2.2. Kullanılan Kimyasallar	36
3.2.3 Solüsyonların Hazırlanması	37
3.2.4 Test Protokolleri	38
3.2.5 DNA İzolasyonu	38
3.2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	38
3.2.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kimyasal Karışımları	38
3.2.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları	38
3.2.9 Jel Elektroforezi	42
3.2.10 PZR Sonrası Temizleme	43
3.2.11 Sekans Reaksiyonu	43
3.2.12 Sekans Reaksiyonu Sonrası PZR Ürünü Temizleme	44
3.2.13 Dizi Analizi	44
4.BULGULAR	45
4.1 Parsiyel Androjen Duyarsızlık Sendromu Ön Tanılı Hasta Grubu	45
4.2 Komplet Androjen Duyarsızlık Sendromu Ön Tanılı Hasta Grubu	45
4.3 Hormon Ölçümleri	46
4.3.1 Parsiyel Androjen Duyarsızlık Sendromu Ön Tanılı Hastalar	46
4.3.2 Komplet Androjen Duyarsızlık Sendromu Ön Tanılı Hastalar	46
4.4 Mutasyon Analizi	47
5.TARTIŞMA	53
6.SONUÇLAR	64
ÖZET	65
SUMMARY	66
KAYNAKLAR	67
EKLER	
Ek 1	83
Ek 2	85

SİMGELELER VE KISALTMALAR

ADP	: Adenozin Difosfat
ADS	: Androjen Duyarsızlık Sendromu
AF1	: Activation Function-1
AF2	: Activation Function-2
AMH	: Antimüllerien Hormon
APOD	: Apolipoprotein D
AR	: Androjen Reseptörü
ARA70	: Androgen Receptor Associated Protein-70
ARDB	: Androgen Receptor Gene Mutations Database
ARE	: Androgen Response Element
Ark.	: Arkadaşları
ATP	: Adenozin Trifosfat
Bmax	: Bağlama Kapasitesi
CARM1	: Coactivator Associated Arginine Methyltransferase-1
cDNA	: Complementary DNA
CGB	: Cinsiyet Gelişim Bozukluğu
Cys	: Sistein
DBD	: DNA-Binding Domain
DHH	: Desert Hedgehog Protein
DHT	: Dihidrotestosteron
DMRT1	: Doublesex- and Mab-3-Related Transcription Factor-1
dL	: Desilitre
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
E	: Glutamik Asit
EMSA	: Electrophoretic Mobility Shift Assay
EMX	: Empty Spiracles Homolog
FGF9	: Glia Activating Factor
FKBP52	: Fk506 Bağlayan Protein-52
FRAP	: Fluorescence Recovery After Photobleaching
FSH	: Follikül Stimule Edici Hormon
G	: Glisin
GFP	: Green Fluorescent Protein
gln	: Glutamin
glu	: Glutamat
gly	: Glisin
GR	: Glukokortikoit Reseptörü
gr	: Gram
HBO1	: K(lizin) Asetiltransferaz-7
HSP	: Heat-Shock Protein
Hsp90	: Heat-Shock 90-kD Protein
I	: İzolösin
Insl3	: Insulin-Like Hormone-3
ile	: izolösin
KADS	: Komplet Androjen Duyarsızlık Sendromu

kb	: Kilobaz
L	: Litre
LBD	: Ligand-Binding Domain
LH	: Lüteotrofik Hormon
LHX9	: LIM/Homeobox Protein Lhx9
LIM1	: LIM/Homeobox Protein Lhx1
M33	: Chromobox Homolog-2
met	: Metionin
mgr	: Miligram
mIU	: Miliinternational Unit
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MR	: Mineralokortikoit Reseptörü
mRNA	: Messenger Ribonükleik Asit
ng	: Nanogram
NLS	: Nükleer Lokalizasyon Sinyali
NTD	: N-Terminal Domain
p23	: Prostaglandin E Synthase-3
PADS	: Parsiyel Androjen Duyarsızlık Sendromu
Phe	: Fenilalanin
Pg	: Pikogram
PR	: Progesteron Reseptörü
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Q	: Glutamin
RNA	: Ribonükleik Asit
SBMA	: Spinal ve Bulber Müsküler Atrofi
SD	: Standart Deviasyon (sapma)
SDF	: Sex-Determining Gen Factor
Ser	: Serin
SF 1	: Steroidojenic Faktör-1
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
SOX9	: SRY-Box 9
SRC1	: Steroid Receptor Coactivator-1
SRY	: Sex-Determining Region Y
T	: Testosteron
TBE	: Tris/Borat/EDTA
TD	: Touchdown
TDF	: Testis-Determining Factor
USG	: Ultrasonografi
V	: Valin
val	: Valin
WT1	: Wilms Tumor Protein
17 β -HSD	: 17 β -Hidroksisteroid Dehidrogenaz
μ L	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1 : Testis farklılaşması ve erkekte dış genital yapının oluşumunda görevli genler. 5
- Şekil 2.2 : AR'de fonksiyonel domain ve alt domain yapıları. Numaralar aminoasit pozisyonlarını, büyük harfler kısaltmaları göstermektedir (X: herhangi bir aminoasit). Birden 8'e kadar olan numaralar ekzonlara aittir. 10
- Şekil 2.3 : Klasik AR döngüsü. Her bir aşama numaralandırılmıştır (1-7): (1) Testosteron, 5α redüktaz ile DHT'ye dönüştürülür; (2) DHT sitoplazmaya göç eder; (3) Ligandın AR'ye bağlanmasıyla HSP ayrılır, ARA70 ve importin-α reseptörü stabilize eder ve (4) nükleusa göçünü sağlar; (5) Nükleusta homodimer oluşumu; (6) Diğer koaktivatörler nükleusta AR'ye bağlanır ve transkripsiyon başlar; (7) Ligand bağlı olmayan AR sitoplazmaya geri göç eder; (8) Alternatif olarak E3 ubiquitinasyonu ve proteazomal yıkım olur. 14
- Resim 4.1 : Tek baz değişikliği saptanan hastaların dizi analizi görüntüleri. 51
- Şekil 5.1 : Memelilerde AR LBD aminoasit dizilimi. AR LBD içindeki 75 aminoasit rezidüsünden oluşan bir dizinin diğer memeli türleriyle homoloji yönünden incelenmesi. Dikdörtgen içindeki q rezidüsü, olgu 2'de mutasyona uğramıştır. 56
- Şekil 5.2 : İnsan nükleer reseptörlerinin homoloji yönünden incelenmesi. Dikdörtgen içine alınan Q rezidüsü, olgu 2'de mutasyona uğramıştır. 56

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1	: Hasta Seçim Kriterleri	30
Tablo 3.2	: <i>Sinnecker</i> Sınıflaması	31
Tablo 3.3	: Hastaların Dış Genital Yapısı, <i>Sinnecker</i> Evresi, Pelvik USG Bulguları ve Fenotipi	32
Tablo 3.4	: PZR'de Kullanılan Primer Dizileri	39
Tablo 3.5	: 1A-D Fragmanları ve Ekzon 2-8'in Çoğaltılmasında Kullanılan Kimyasal Karışım	40
Tablo 3.6	: 1 A ve D Fragmanlarının Çoğaltılmasında Uygulanan TD PZR Koşulları	41
Tablo 3.7	: 1 B, C Fragmanları ve Ekzon 2-8'in Çoğaltılmasında Uygulanan PZR Koşulları	42
Tablo 3.8	: Sekans Reaksiyonunda Kullanılan Kimyasal Karışım	43
Tablo 3.9	: Sekans Reaksiyonunda Uygulanan Sıcaklık ve Süreler	44
Tablo 4.1	: İlk Başvurudaki Takvim Yaşı, Kemik Yaşı, Aile Öyküsü, Başvuru Nedeni ve Meme Gelişim Evresi	48
Tablo 4.2	: Hormon Ölçümleri	49
Tablo 4.3	: Androjen Reseptöründe Değişikliğe Neden Olan Mutasyonlar	52
Tablo 4.4	: Androjen Reseptöründe Değişikliğe Neden Olmayan Sessiz Mutasyonlar	52

1. GİRİŞ

Kromozom kuruluş, gonad oluşumu veya anatomik olarak cinsel organların gelişimindeki problemler cinsiyet gelişim bozuklukları (CGB) olarak adlandırılan bir takım konjenital rahatsızlıklara neden olmaktadır. 46,XY CGB'de dış genital yapının fenotipi; normal dişi, kuşkulu genital yapı (*ambiguous*) veya mikropenisi (yaşa göre penis boyunun 2,5 SD'nin altında olması) olan bir erkek olabilir (1).

Androjen reseptör bozukluğu androjen duyarsızlık sendromu (ADS) olarak adlandırılan klinik tabloya neden olmaktadır. Androjenlere karşı reseptör direncinin düzeyine bağlı olarak komplet formda *XY sex reversal* ve dişi fenotip görülürken, kısmi direnç söz konusu olduğunda yeni doğanlarda sık karşılaşılan kuşkulu genital yapı gelişmektedir. Ancak benzer fenotipler testis oluşumunda ve androjen biyosentezindeki bozukluklarda da görülebilir. ADS yenidoğanlarda 1/20,000-64,000 sıklığında bildirilmektedir.

Androjen reseptörü (AR) çok sayıda fizyolojik süreçte ve gelişim aşamalarında görev almaktadır. Androjenlerin biyolojik etkileri hücre içinde bulunan AR üzerinden yerine getirilmektedir. AR, X kromozomunun uzun kolunda yerleşen AR geni tarafından kodlanmakta olup, nükleer reseptör üst familyasına ait bir transkripsiyon faktörüdür.

Androjen reseptör geni mutasyonları, farklı derecelerde reseptör hasarına neden olarak, androjen üretimi ve metabolizması normal, 46,XY karyotipe sahip bireylerde farklı ağırlıktaki fenotiplerin ortaya çıkmasından sorumludur. ADS'de ortaya çıkan fenotip ile genotip arasında çoğunlukla güçlü bir korelasyon kurulamamaktadır. Mutant reseptörlerde yapılan fonksiyonel çalışmalar ve üç boyutlu modelleme yöntemleri, androjenlerin etki mekanizmalarının anlaşılmasında faydalı bilgiler sunmaktadır. ADS'de, cinsiyet tayini, tümör riski nedeniyle gonadektominin zamanlaması, hasta ve aileye genetik ve psikolojik danışma verme süreci, hastalığın yönetiminde en önemli

konulardır. Bu bağlamda, ADS'de moleküler genetik tanının yeri tedaviye sağlayacağı katkı nedeniyle büyük önem taşımaktadır.

T/DHT (testosteron/dihidrotestosteron) testinin spesifisitesi düşük olup, ADS'de kesin tanıya giderken yardımcı bir test olarak aday hastaların seçiminde kullanılması daha idealdir (2). Referans değerler doğru biçimde belirlendiği takdirde, hCG (human chorionic gonadotropin) uyarı testi sonrası elde edilen T/DHT değerleri daha duyarlı sonuçlar vermektedir. Ancak birçok merkezde bu testi yapma imkanı bulunmamaktadır (3).

ADS ön tanısına sahip bireylerde yapılan fizik muayene, hormonal değerlendirme ve görüntüleme yöntemleri kesin tanıya ulaşmada zayıf ve yetersiz kalmaktadır. Yapılan çalışmada, ADS ön tanısı bulunan hastalarda kesin tanı koyabilmek amacıyla AR geninde dizi analizi yapılmıştır. Bu şekilde, yukarıda belirtilen hasta yönetimindeki konuların doğru bir biçimde ve hızla yerine getirilmesine katkı sağlamak hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Gonadların ilk oluşumunda her iki cinsiyette de kritik öneme sahip *Wilms tumor protein* (WT1), steroidojenik faktör 1 (SF1), *LIM/homeobox protein Lhx1* (LIM1), *empty spiracles homolog* (EMX) ve *LIM/homeobox protein Lhx9* (LHX9) ve diğer birçok gen görev almaktadır (4-7). Erkeklerde normal seksüel gelişim 6. haftada testis farklılaşmasıyla başlamaktadır. Testis farklılaşması, desert hedgehog protein (DHH), *glia activating factor* (FGF9), *chromobox homolog 2* (M33), *doublesex- and mab-3-related transcription factor 1* (DMRT1), AMH (antimüllerien hormon), SRY (sex-determining region Y) ve SOX9 (SRY-box 9) gibi genlerin aktivasyonu ve etkileşimleriyle olmaktadır (8-12). SOX9, testis gelişimini başlatan gen; SRY ise erkeklerde cinsiyeti belirleyen gen (sex-determining gen factor, SDF) olarak kabul edilmektedir (13). SRY tarafından aktive edilen AMH, müllerien yapıların dejenerasyonunu sağlayarak cinsel organların erkek yönde gelişmesine yardım etmektedir. Androjenler, AR üzerinden ortaya çıkardıkları etki ile *wolf* kanalından rete testis, efferent kanalcıklar, epididimis, vas deferens, seminal vezikül ve prostat oluşumunu gerçekleştirmektedir (14).

2.1 Genital Sistem Embriyolojisi

Erkek cinsel farklılaşması ve gelişiminde birçok gen görevli olmasına rağmen, androjenlerin kontrol ettiği genler bu süreçte temel bir rol oynamaktadır. Androjen aktivitesiyle, her iki cinsiyet yönünde farklılaşma potansiyeline sahip iç ve dış genital yapılar, geri dönüşümsüz olarak erkek yönde farklılaşma göstermektedir (Şekil 2.1).

Embriyonun cinsiyeti genetik olarak fertilizasyon ile belirlenmektedir. Ancak gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar erkek veya dişi yönde morfolojik özellik göstermemektedirler.

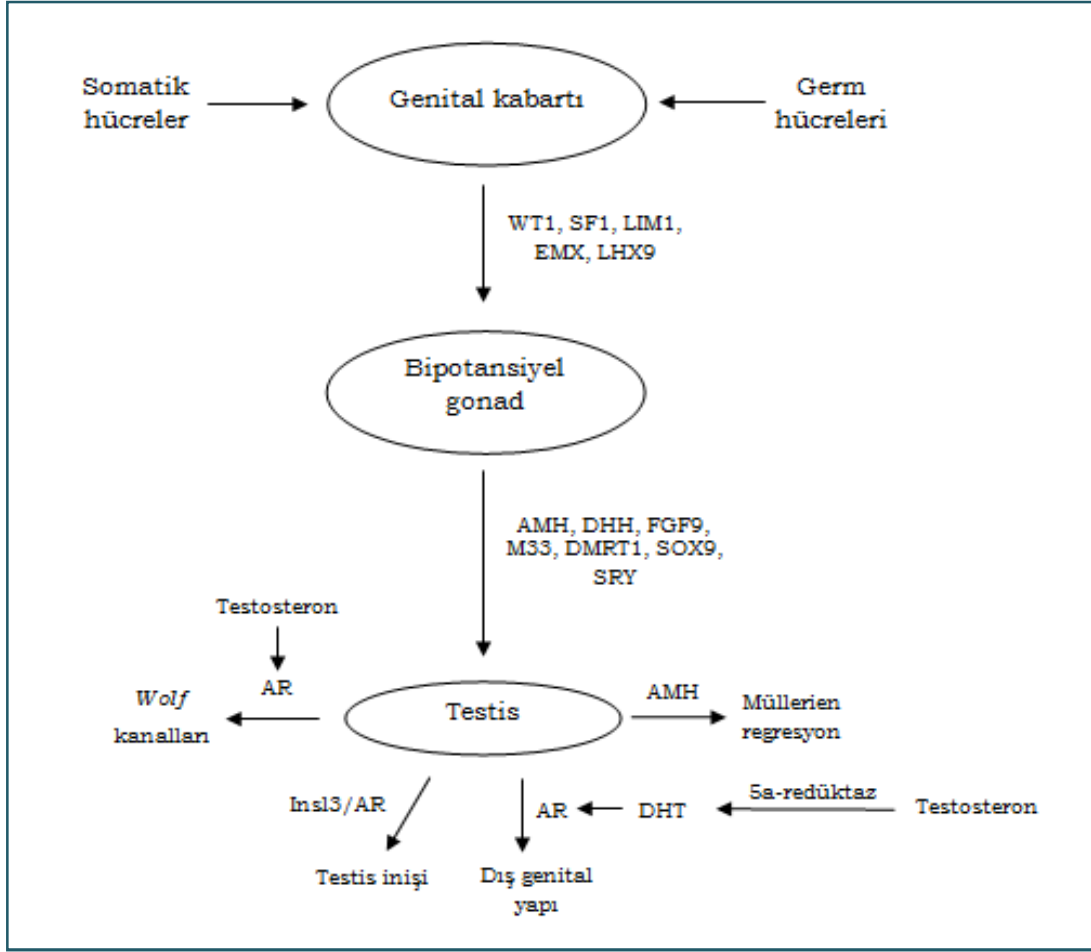
Gonadlar, erken evrede genital veya gonadal kabartı olarak isimlendirilen bir çift dikey yapıdan oluşur. Genital kabartı, çöломik epitelin proliferasyonu ve alttaki mezenşimin yoğunlaşması ile meydana gelir. Germ hücreleri 6. haftaya kadar genital kabartıda görülmemektedir.

İnsan embriyosundaki primordiyal hücreler gelişimin erken evresinde allantois yakınındaki yolk kesesi duvarında endoderm hücreleri arasında oluşmaya başlamaktadır. Primordiyal hücreler amiboid hareketlerle arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca göç ederek 5. haftanın başlangıcında primitif gonadlara ulaşır ve gelişimin 6. haftasında genital kabartılara yerleşirler. Bu göç gerçekleşmediği takdirde gonad gelişimi olmamaktadır. Primordiyal germ hücreleri, gonadların over veya testis yönünde gelişmesinde indükleyici bir role sahiptir.

Primordiyal hücreler, genital kabartıya ulaşmadan kısa bir süre önce buradaki çöломik epitel hücreleri çoğalmaya başlar ve penetrasyon yoluyla mezenkim altına geçer. Bu şekilde, primitif seks kordonları adı verilen düzensiz şekilli yapılar oluşmaya başlar. Bu kordonlar dişi ve erkek embriyolarda yüzey epiteline yapışıktır ve herhangi bir yönde farklılaşmaları olanaksızdır. Bu yapı farklılaşmamış gonad olarak isimlendirilmektedir.

2.1.1 Testis Gelişimi

Genetik olarak erkek olan embriyo XY kromozom yapısına sahiptir. Y kromozomunun sentezlediği *testis-determining factor* (TDF) etkisiyle, primitif seks kordonları çoğalmaya devam ederek medullayı geçer; testis veya meduller kordonları oluşturur. Meduller kordonlardan daha sonra rete testis yapısı gelişmektedir. Gelişimin ileri aşamalarında, testis kordonlarının yüzey epiteli ile bağlantısı koparak arada *tunica albuginea* (beyaz tabaka) olarak isimlendirilen fibröz konnektif doku oluşur.



Şekil 2.1 Testis farklılaşması ve erkekte dış genital yapının oluşumunda görevli genler. Hughes (15)'den uyarlanmıştır.

Dördüncü ayda testis kordonları at nalı şeklini alır ve kordonların devamında rete testis yapısı bulunur. Bu dönemde testis kordonları primitif germ hücrelerini ve sertoli hücrelerini içermektedir.

Leydig hücreleri gonad kabartısındaki mezenkimden köken almaktadır. Leydig hücreleri testis kordonlarının farklılaşmasından hemen sonra oluşmaktadır. Gebeliğin 8. haftasında fetal gonadlarda bulunan leydig hücreleri tarafından testosteron üretimi başlamaktadır ve bu aşamada testisler genital kanal (duct) ve dış genital yapı farklılaşmasını başlatabilecek yetenektedir. Testosteron, *wolf* kanallarında eksprese edilen AR üzerinde lokal etki yaparak bu yapıların dejenerasyonunu önlemekte; vas deferens, epididimis ve

seminal vezikülün oluşumunu sağlamaktadır (16).

Testosteron kana salındıktan sonra etkisini endokrin olarak göstermektedir. Bu şekilde genital tüberkülden dış genital yapının farklılaşmasında ve prostat morfogenezinde görev yapmaktadır. Testosteronun fetal dokulardaki konsantrasyonu düşüktür. Ancak dış genital yapı ve prostat dokusunda 5 α -redüktaz tip II enzimi tarafından testosterondan dihidrotestosteron meydana gelmektedir (17). Dihidrotestosteron, testosterona göre 10 kat daha güçlü bir etki oluşturmaktadır (18).

Testis kordonları puberte dönemine kadar solid tabiatta kalırlar. Kordonlarda lümen oluşuktan sonra seminiferöz tübül olarak adlandırılırlar. Seminiferöz tübüller rete testis ile birleşmektedir. Rete testislerin devamı efferent kanalcıklar (ductuli efferentes) olarak isimlendirilmektedir. Efferent kanalcıklar, rete testis ile mezonefrik kanal veya *wolf* kanalı olarak da bilinen deferens kanal (ductus deferens) arasında bağlantı kurmaktadır.

2.1.2 Genital Kanalların Farklılaşması

Genital kanalların gelişimi ve dış genital yapının oluşması, intrauterin hayatta fetüste dolaşan hormonların etkisi altında meydana gelmektedir. Fetal testislerden salgılanan AMH paramezonefrik kanalın gerilemesine neden olur. Testosteron, testislerde üretilen ve hedef dokulara ulaşan majör androjendir. Testosteron, dokularda 5 α redüktaz enzimi aracılığıyla dihidrotestosterona dönüştürülür. Testosteron, mezonefrik kanalların virilizasyonuna aracılık ederken; dihidrotestosteron ise erkekte dış genital yapının gelişmesini sağlamaktadır (Şekil 2.1).

Mezonefrozun gerilediği esnada bazı boşaltıcı (excretory) tübüller (epigenital tubules), rete testis kordonları ile bağlantı kurarak efferent kanalcıkları meydana getirir. Mezonefrik kanallar, erkekte ana genital kanalların köken aldığı yapıdır. Efferent kanalcıklardan sonra

mezonefrik kanal uzun ve kıvrımlı bir hal alır; bu yapı duktus epididimis olarak adlandırılmaktadır. Mezonefrik kanal, duktus epididimis ile seminal vezikül arasında kalın bir kas tabakası kazanır. Bu yapı duktus deferens olarak isimlendirilir. Seminal vezikülden sonraki yapıya ise ejakülatör kanal denilmektedir.

Embriyo gelişiminin 3. haftasında primitif çizgiden (streak) köken alan mezenkim hücreleri, kloakal membran civarına göç ederek burada bir çift kloakal katlanma meydana getirir. Bu katlanmalar membranın kranyal kısmında birleşerek genital tüberkül yapısını oluşturmaktadır. Altıncı haftada, kloakal membran ürogenital ve anal membranlara bölünür. Kloakal katlanmalar ise üretral ve anal katlanmaları meydana getirmektedir. Bu olaylar devam ederken, üretral katlanmaların yan kısımlarında genital şişkinlikler (swelling) oluşur. Bu şişkinliklerden, erkeklerde skrotal şişkinlik olarak isimlendirilen yapılar gelişmektedir.

Prostat, organogenezin ilk aşamalarında epitelyal tomurcuktan oluşmaya başlamaktadır. Bu dönemde sadece epitelyum çevresinde bulunan mezenkimde androjen reseptör ekspresyonu gerçekleşmekte; epitelyal tomurcuğun gelişiminin, mezenkimden epitele iletilen androjen bağımlı parakrin sinyaller aracılığıyla olduğu bilinmektedir (19). Gebeliğin 10-12. haftalarında, ürogenital sinüsten dışarıya doğru uzanan bir çıkıntıdan prostat morfogenezi başlamaktadır. Androjenler prostat morfogenezi ve farklılaşması için yeterlidir.

2.1.3 Testislerin İnişi

Testislerin ürogenital kabartıdan skrotuma inişi AR bağımlı bir olaydır. Testis inişi embriyo gelişiminin 10. haftasında başlar ve iki fazda gerçekleşir (20). Transabdominal faz, fetal testislerde bulunan leydig hücreleri tarafından sentezlenen peptid hormon *Insulin-like hormone-3* (Ins13) aracılığıyla gerçekleşmektedir (21). İnguinoskrotal faz (26-35. haftalar arası), başlıca AR aracılığıyla kontrol

edilmektedir. Androjen duyarsızlık sendromunda, testis inişindeki probleme bağlı olarak abdominal veya inguinal yerleşim görülmektedir (22). Testiküler inişte AR aktivitesinin başlıca etki yerinin gubernakulum olduğu bildirilmiştir; androjen direnci olan fare ve ADS tanılı insanlarda yapılan çalışmalarda gubernakulum göçünün olmadığı gösterilmiştir (23). Ancak AR ekspresyonunun ve 5 α redüktaz aktivitesinin gubernakulumda düşük olduğu ve androjenlerin gubernakulum üzerine olan etkilerinin dolaylı bir mekanizma ile gerçekleştiği bildirilmektedir (24).

2.1.4 Erkeklerde Dış Genital Yapı

Erkeklerde dış genital yapıların gelişmesi, fetal testislerden salgılanan androjenlerin etkisi altında genital tüberkülün hızlı bir şekilde uzaması ve fallusu oluşturmasıyla başlar. Fallus uzadığı sırada, üretral katlanmaları ileri doğru çekerek üretral yarığın (groove) yan duvarlarını oluşturur. Üretral yarık fallusun kaudal yönünde uzar, ancak en distal kısımda bulunan glans bölgesine ilerlemez. Üretral yarığın epiteli endoderm kökenlidir ve buradan üretral plak oluşmaktadır.

Üçüncü ayın sonunda üretral katlanmalar, üretral plağın üzerine kapanarak penil üretrayı oluşturur. Bu kanal, fallusun en uç kısmına kadar uzanmaz. Üretranın distal kısmı, 4. ayın sonunda glans ucundaki ektoderm kökenli hücrelerin iç tarafa göç etmesi ve burada kısa bir epitelyal kordon oluşturmasıyla meydana gelmektedir. Bu kordon daha sonra lümen kazanarak eksternal üretral meatusu oluşturmaktadır.

Erkeklerde skrotal şişkinlik olarak da bilinen genital şişkinlikler, başlangıçta inguinal bölgede bulunurlar; ancak gelişimin ileri aşamalarında her biri skrotumun bir yarısını oluşturmaktadır. İkisi arasında skrotal septum bulunmaktadır.

2.2 Androjen Reseptörü

Androjen reseptörü, Xq11-12'de bulunan yaklaşık 90 kb içeren AR geni tarafından kodlanmaktadır. Sekiz ekzondan oluşan *open reading frame* 2760 nükleotit içermekte olup, 920 aminoasit rezidüsünden oluşan androjen reseptörünü kodlamaktadır. AR geni (MIM: 313700) hemizigot özellikte olması nedeniyle mutasyon varlığında erkek cinsiyet gelişimi doğrudan etkilenmektedir. AR geni için heterozigot olan kadın, taşıyıcı durumundadır ve mutasyonu çocuklarına aktarabilir.

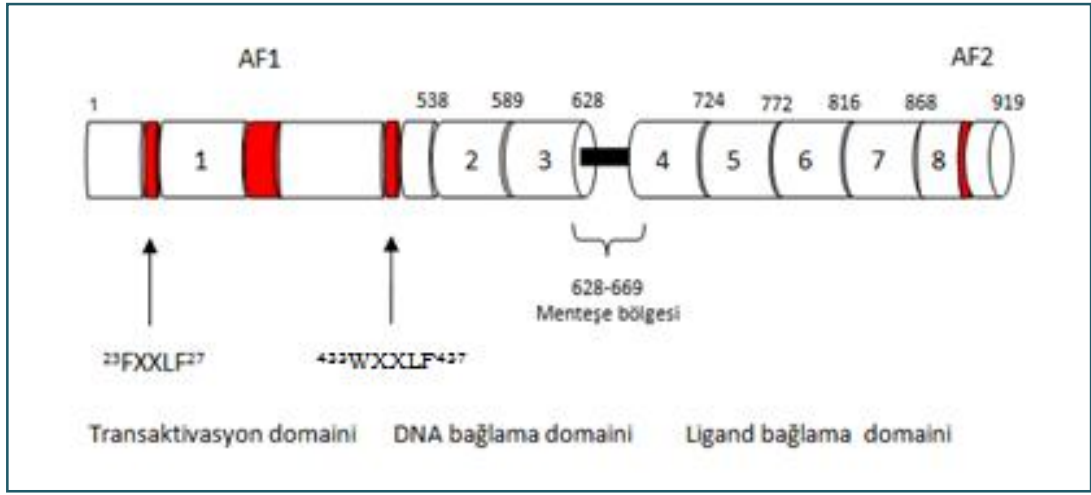
2.2.1 Androjen Reseptör Yapısı

Androjen reseptörü büyük olasılıkla aynı atasal genden köken alan kromatine bağlanan proteinler içinde bulunan steroid reseptör alt familyasına mensuptur.

Nükleer reseptör üst familyasında, birbiriyle homoloji gösteren androjen reseptörü, glukokortikoid reseptörü (GR), mineralokortikoid reseptörü (MR) ve progesteron reseptörü (PR), ortak *response element*lere bağlanarak gen transkripsiyonu yapan dördü bir gruptur. AR birçok nükleer reseptörde bulunan fonksiyonel domainleri yapısında barındırmakla beraber kendine özgü özelliklere sahiptir. Ekzon 1 tarafından kodlanan (1-538. aminoasitler) N terminal domainde (NTD) ligand bağımsız AF1 (*activation function 1*) alt domaini bulunmaktadır. Ekzon 2-3 tarafından kodlanan (538-627. aminoasitler) deoksiribonükleik aside (DNA) bağlanma domaini (DBD) hedef genlerin promoter ve *enhancer* bölgelerinde reseptörün *androgen response element* (ARE)'lere tutunmasına aracılık etmektedir. Ekzon 4-8 tarafından kodlanan (668-919. aminoasitler) ligand bağlama domaini (LBD) ligand bağımlı AF2 (*activation Function 2*) alt domainini bulundurmaktadır. DBD ve LBD arasında bağlantıyı sağlayan menteşe bölgesi (628-669. aminoasitler) hormon

bağlanmasıyla yapısal değişikliğe uğramaktadır (25, 26) (Şekil 2.2).

NTD içinde, 9-36 glutamin (Q) tekrarı ve 10-27 glisin (G) tekrarı bulunmaktadır. Poliglutamin tekrar uzunluğuyla AR aktivitesi arasında ters orantı olabilir (27). Poliglutamin tekrar sayısının 40'ın üzerine çıkması, spinal ve bulber müsküler atrofiye (SBMA veya Kennedy hastalığı) neden olmaktadır (28).



Şekil 2.2 AR'de fonksiyonel domain ve alt domain yapıları. Numaralar aminoasit pozisyonlarını, büyük harfler kısaltmaları göstermektedir (X: herhangi bir aminoasit). Birden 8'e kadar olan numaralar ekzonlara aittir. Hughes (15)'den alınmıştır.

NTD'nin eriyik-globin (molten-globin) benzeri bir yapıya sahip olduğu ve transkripsiyon regülatörlerinin indüklemesiyle ileri yapısal özellikler elde ettiği düşünülmektedir (29). Bunun aksine, DBD ve LBD ileri düzey yapısal özelliklere sahiptir ve steroid reseptör ailesi içinde korunmuş bölgelerdir. DBD yapısında bulunan dokuz adet sistein rezidüsünden sekizi, iki adet çinko parmak (zinc finger) yapısının meydana gelmesini sağlamaktadır. Çinko parmak yapısı, birçok nükleer reseptör ve transkripsiyon faktörünün karakteristik özelliğidir. *P-box*, birinci çinko parmak yapısıdır; ARE'de bulunan DNA büyük oluğuna (major groove) bağlanarak spesifik DNA

bölgelerinin tanınmasını sağlamaktadır. İkinci çinko parmak olan *D-box* ise reseptör dimerizasyonu ve protein-protein etkileşimlerinde görevlidir (30). Çinko parmak yapıları, DNA major oluğu ile etkileşime geçerek AR'nin hedef genlere bağlanmasını gerçekleştirmektedir. LBD, 12 adet α -heliks ve 4 adet üç tabakalı bir yapı oluşturan küçük β -zincir içermektedir (31). Hormon bağlanmasını takiben 12 numaralı heliks, LBD'nin merkezine doğru katlanır ve ligand bağlama cebini tıpkı bir kısıkaç gibi yakalar (32). Bu yolla, LBD yüzeyinde ko-regülatörlerin LXXLL ve FXXLF benzeri motifleriyle ve androjen reseptörünün ²³FQNLF²⁷ motifinin bulunduğu NTD ile etkileşime girebilen hidrofobik bir oluk oluşmaktadır (33).

AF1 ve AF2 transkripsiyon aktivasyonunda görev alan başlıca alt domainlerdir. AF1 ligand bağımsız, AF2 ise ligand bağımlı olarak çalışmaktadır ve aynı zamanda *steroid receptor coactivator 1* (SRC1), SRC2 ve SRC3 gibi reseptör koaktivatörleriyle etkileşime girebilmektedir (34). Nükleer reseptörlerin çoğunda AF2, koaktivatörlerde bulunan LXXLL motifleriyle güçlü etkileşimler kurmaktadır. Ancak AR'nin varlığında AF2, NTD yapısındaki AF1 ile etkileşim kurmaktadır ve AF2'nin koaktivatörler ile etkileşimi daha zayıf kalmaktadır (35).

N/C etkileşiminin AR'ye özgü bir özellik olduğu söylenebilir. N/C etkileşimine NTD'de bulunan LXXLF motifi aracılık etmektedir. N/C etkileşimi, AR'yi stabilize ederek reseptör-ligand ayrışmasını (dissociation) yavaşlatmaktadır.

2.2.2 Androjen Reseptör Fizyolojisi ve Reseptörün Genom Üzerindeki Aktivitesi

Androjenler prenatal dönemden itibaren sekonder cinsiyet farklılaşmasında fonksiyon görmektedir. Reseptör-testosteron kompleksi, embriyoda *wolf* kanalı yapılarının farklılaşmasını, hipotalamus-hipofiz aksından luteotrofik hormon (LH) salgılanmasını

ve spermatogenezi sağlamaktadır. Reseptör-DHT kompleksi embriyogenez sürecinde prostat farklılaşması ve puberte dönemindeki değişikliklerin ortaya çıkmasından sorumludur (36).

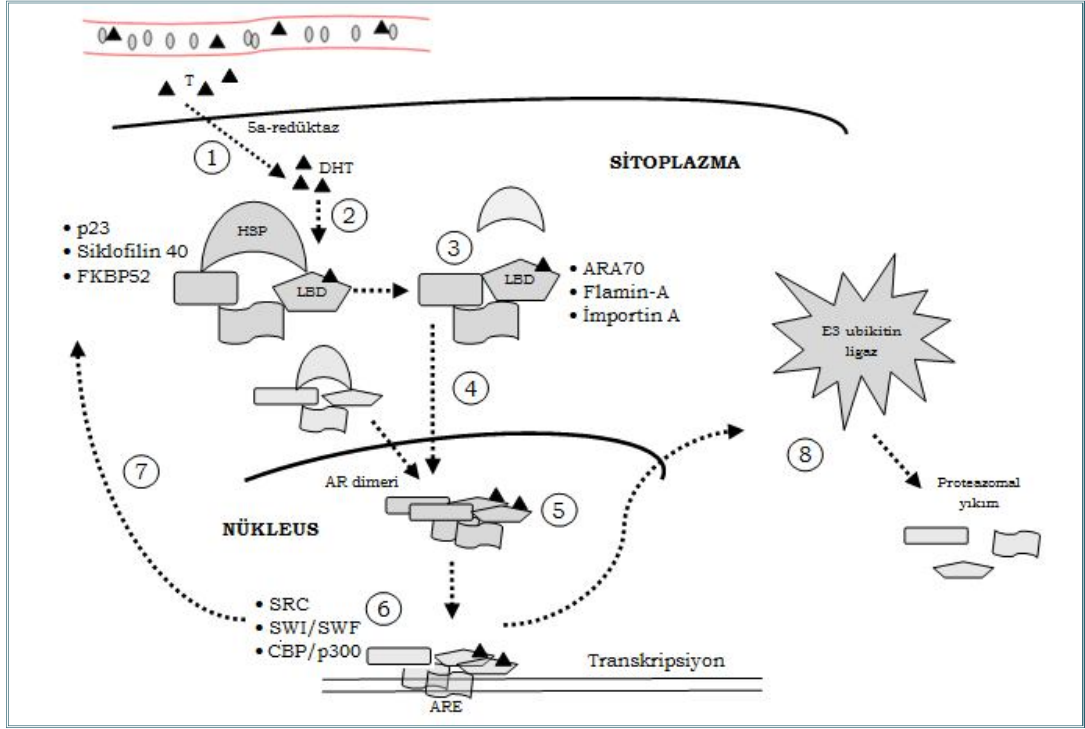
Androjen aktivitesinde görevli başlıca androjenler testosteron ve dihidrotestosterondur. Dihidrotestosteron, testosterondan 5 α redüktaz tip 2 enzimi aracılığıyla oluşturulmaktadır. DHT başlıca testis dışı dokularda görev yapmaktadır. Bu iki hormon ayrıca AR'nin genom üzerindeki etkilerinin ortaya çıkmasında da asıl olarak görev yapmaktadır.

Androjen reseptörü ligand bağlı değilken, moleküler şaperon *Heat-Shock 90-kD Protein* (Hsp90) ve Hsp90'ın reseptöre bağlanmasını stabilize eden *prostaglandin E synthase 3* (p23), siklofilin 40 ve FK506-bağlayan protein-52 (FKBP52) gibi ko-şaperonlar ile büyük bir kompleks oluşturmuş halde sitoplazmada yerleşmektedir. Ligand bağlandıktan sonra *heat shock protein* (HSP) kompleksinin kompozisyonu değişir ve androjen reseptöründe yapı (conformation) değişikliği meydana gelir. NTD ve LBD etkileşime girerek şaperon kompleksinin AR'den ayrılması gerçekleşmekte ve bu etkileşim iki adet bazik aminoasit grubu içeren menteşe bölgesi ve DBD içindeki nükleer lokalizasyon sinyalinin (NLS) ortaya çıkmasına neden olmaktadır. HSP'nin reseptörden ayrılması, *androgen receptor associated protein-70* (ARA70), flamin-A ve importin-a gibi ko-regülatörlerin AR ile etkileşime geçmesini mümkün kılmaktadır. Bu etkileşim AR'nin nükleusa göçüne ve dimerizasyonuna yardım etmektedir (37). Daha sonra hızlı bir şekilde nükleusa göç eden AR, homodimer oluşturarak ARE'lere bağlanmaktadır (38) (Şekil 2.3). ARE'lerde bulunan *promoter* ve *enhancer* dizileri monomerik ve dimerik AR bağlama bölgeleri içermektedir. Bu diziler, AR'nin kromatine bağlanmasını kolaylaştıran transkripsiyon faktörleri için de çok sayıda bölge bulundurmaktadır (25).

AR, ARE'ye bağlandıktan sonra transkripsiyon başlangıç kompleksini (transcription pre-initiation complex) bu bölgede toplar,

hedef *promoter* üzerindeki bazı transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girer veya transkripsiyonu başlatmak veya baskılamak (sırayla koaktivatör ve ko-represör) amacıyla bir takım ko-regülatör proteinlerin toplanmasını sağlar. Günümüze kadar AR'ye ait 200 kadar ko-regülatör protein tanımlanmıştır (39).

AR ko-regülatörleri diğer transkripsiyon faktörlerinden farklı olarak DNA'ya doğrudan bağlanmadan ve bazal transkripsiyon düzeyine etki etmeden, enzimatik aktiviteleri sayesinde hedef genlerin ekspresyon düzeyini artırarak veya baskılayarak fonksiyon görmektedir. AR ko-regülatörleri kromatin modifikasyonu üzerine etki ederler veya bazal transkripsiyon makinesi ile AR arasında bağlantı kurulmasını sağlarlar. Enzimatik aktiviteleri, AR, diğer ko-regülatörler veya kromatin üzerinde gerçekleşebilir. Enzimatik aktivite sayesinde posttranslasyonel modifikasyonlar (fosforilasyon, ubiquitinasyon, sumolasyon, asetilasyon, metilasyon, adenozin difosfat (ADP)-ribozilasyonu yapılarak devamlı bir şekilde kromatin ve transkripsiyon kompleksinin yenilenmesi sağlanmaktadır. SRC ve adenozin trifosfat (ATP) bağımlı SWI/SNF kompleksleri, *coactivator associated arginine methyltransferase* (CARM1) veya CBP/p300 gibi histon asetilazlar üzerinden transkripsiyon aktivitesinin indüklenmesine yardım etmektedir. Kromatin *remodeling* kompleksleri, ribonükleik asit (RNA) polimeraz II'nin transkripsiyon aktivitesini başlatabilmesi için gerekli olan açık kromatin yapısının oluşması için gerekmektedir. Kofaktörlerin AR ve transkripsiyon faktörleri üzerindeki posttranslasyonel modifikasyonları sayesinde protein stabilitesi, protein-protein etkileşimleri ve yaptıkları fonksiyonlar, 26S proteazom tarafından gerçekleştirilen degradasyon ve dönüşüm işlemleri veya transkripsiyon komplekslerine ait komponentlerin nükleus ile sitoplazma arasındaki göçü mükemmel bir şekilde kontrol edilerek hedef genlerin ekspresyonu dinamik olarak gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Klasik AR döngüsü. Her bir aşama numaralandırılmıştır (1-7): (1) Testosteron, 5α-redüktaz ile DHT'ye dönüştürülür; (2) DHT sitoplazmaya geç eder; (3) Ligandın AR'ye bağlanmasıyla HSP ayrılır, ARA70 ve importin-a reseptörü stabilize eder ve (4) nükleusa geçişini sağlar; (5) Nükleusta homodimer oluşumu; (6) Diğer koaktivatörler nükleusta AR'ye bağlanır ve transkripsiyon başlar; (7) Ligand bağlı olmayan AR sitoplazmaya geri geç eder; (8) Alternatif olarak E3 ubiquitinasyonu ve proteazomal yıkım olur. Bennett ve ark.(40)'dan uyarlanmıştır.

2.3 Androjen Reseptör Gen Mutasyonları ve Fenotipik Değişkenlik

Androjen duyarsızlık sendromuna neden olan 600'den fazla mutasyon bildirilmiştir. Bu mutasyonlar ve sebep oldukları klinik ve moleküler fenotipik değişiklikler bir veritabanında (41) toplanmaktadır.

AR gen mutasyonlarının çoğu kalıtsal olmakla beraber; üçte bir kadarı *de novo* (yeni) olarak görülmektedir (42). Mutasyonlar, sırayla % 20 ve % 60 oranında C terminal bölgeyi oluşturan DBD ve LBD bölgelerinde bulunmaktadır (43).

Yanlış anlamlı mutasyonlar (missense mutations) farklı fenotiplere neden olan en sık mutasyon tipidir. DBD ve LBD'yi etkileyen yanlış anlamlı mutasyonlar, protein üzerinde oluşturulan hasar düzeyine bağlı olarak ADS'nin bütün tiplerine neden olabilir. NTD'yi etkileyen az sayıdaki yanlış anlamlı mutasyon hafif veya parsiyel formlar ile ilişkili bulunmuştur (44).

Tüm gen delesyonu, parsiyel delesyonlar, insersiyonlar, duplikasyonlar ile erken zincir sonlanmasına neden olan *nonsense* (anlamsız) ve kalıp kayması mutasyonları (*frameshift*), komplet androjen duyarsızlık sendromuna (KADS) neden olmaktadır (42, 45).

Splice-site mutasyonları, hem komplet hem de parsiyel formlarla ilişkili bulunmuştur (46). *Splice-site* mutasyonlarını tespit etmek zordur. Parsiyel androjen duyarsızlık sendromu (PADS) tanısı ile izlenen bir hastada AR ekzon 8'deki sessiz bir mutasyonun (silent mutation) kısmi *aberrant splicinge* neden olduğu gösterilmiştir. Bu hastada rezidüel olarak devam eden yaban tip AR ekspresyonuna bağlı olarak, fenotipin PADS olarak ortaya çıktığı düşünülmüştür (47).

Post-zigotik olarak meydana gelen mutasyonların tespit edilmesi de bazen zor olabilmektedir. AR'de meydana gelen post-zigotik mutasyonların neden olduğu somatik mozaikizm ile birlikte görülen az sayıda ADS vakası bildirilmiştir (48). Somatik mozaikizmde, değişik dokulardaki mutant ve yaban tip (*wild type*) AR ekspresyonu yapan hücrelerin oranları farklılık göstermektedir. Bu bağlamda, belli bir mutasyon mutant hücrelerin dağılımına bağlı olarak farklı fenotipler ortaya çıkarabilir. ADS tanısı konulan hastalarda bilinen bütün mutasyon tiplerine ait somatik mozaiklik bildirilmiştir; bu mutasyonların komplet veya parsiyel forma neden olduğu görülmüştür.

Bazı hastalarda komplet veya parsiyel fenotipe neden olan bazı mutasyonların normal bir bireyde de tespit edildiği bildirilmiştir (43, 49). Örnek olarak; Q798E mutasyonunun bazı hastalarda PADS'ye

neden olduğu ve bu bireylerin kız olarak büyütüldükleri bilinmektedir (50). Aynı mutasyonu taşıyan farklı bireylerde ise fenotipin infertilite ve hafif (mild) form olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir (51).

L712F, I737T ve F725L mutasyonları aynı aile içinde farklı düzeylerde PADS fenotipleri ortaya çıkarmıştır (52). Bu mutasyonların androjen bağlama kapasitesini etkilemeksizin, AF2 yapısında ve N terminal/C terminal (N/C) etkileşiminde bozukluğa neden olduğu bildirilmiştir. Parsiyel forma neden olan mutasyonların ortaya çıkardığı fenotipik değişkenlik, reseptör üzerinde belli rezidüleri etkileyen mutasyonlara özel bir durum olabilir.

2329G>T değişikliğinin (TGC>TTC) KADS'ye neden olduğu bildirilmiştir (53). Aynı nükleotidin sitozone dönüşmesi (TGC>TCC) sonucunda bir başka hastada PADS ortaya çıktığı görülmüştür (54). Bu mutasyonların protein üzerinde neden olduğu aminoasit değişikliklerine bakıldığında, birinci örnekte polar bir aminoasit olan sistein (cys) yerine nonpolar ve aromatik bir aminoasit olan fenilalanin (phe); ikinci örnekte ise polar bir aminoasit yerine, yine polar bir aminoasit olan serinin (ser) geldiği görülmüştür. İkinci örnekteki aminoasit değişikliğinin protein içinde bu bölgeye ait iyonik çevreyi az etkilemesine bağlı olarak PADS'ye neden olduğu düşünülmüştür (54).

In-frame delesyonlar nadir görülen mutasyonlardır. NTD içinde, dokuz nükleotitden oluşan bir delesyonun PADS'ye neden olduğu bildirilmiştir. NTD içinde üç nükleotitden oluşan bir insersiyonun tespit edildiği vakada ise fenotip erkek infertilitesi olarak ortaya çıkmıştır. Ancak bu iki değişikliğin fonksiyonel olarak hangi mekanizmayla bu fenotipleri ortaya koyduğu anlaşılamamıştır (55).

ADS nadir görülen bir hastalık olması nedeniyle, aynı mutasyonu taşıyan ve parsiyel fenotipe sahip az sayıda hasta bulunmaktadır. Bu durum belli bir mutasyonun ortaya çıkarabileceği virilizasyon derecesinin öngörülmesi için sorun teşkil etmektedir.

Ancak genetik danışmanlık ve hasta yönetimi açısından, bir mutasyonun puberte döneminde hangi düzeyde virilizasyona izin vereceği ve puberte açısından nihai fenotipin ne olacağı kestirilmesi gerekmektedir. AR gen mutasyonlarının neden olduğu virilizasyon bozukluklarının ne tür bir mekanizmayla meydana geldiğinin anlaşılması amacıyla, hasta popülasyonlarında tespit edilen bu mutasyonların *EuroDSD* (www.euroids.eu) projesi kapsamında analiz edilmesi hedeflenmektedir.

2.3.1 Glutamin ve Glisin Tekrar Polimorfizmleri

AR geni, ekzon 1 üzerinde CAG (glutamin) ve GGC (glisin) üçlü (trinucleotide) tekrar polimorfizmleri göstermektedir. Sağlıklı bireylerde, glutamin tekrar sayısı 9-36; glisin tekrar sayısı 10-27 arasında değişmektedir. İn vitro deneylerde, poliQ ve poliG tekrar sayısı ile androjen reseptör aktivitesi arasında ilişki bulunduğu gösterilmiştir. Uzun poliQ tekrarları AR aktivitesini azaltırken (56); uzun poliG tekrarları AR aktivitesini artırmaktadır (57). Tekrar sayısı polimorfizmlerinin sperm üretimi ve erkek infertilitesi üzerine olan etkileriyle ilgili yapılan çalışmalar birbirinden farklı sonuçlar bildirmektedir.

2.4 Androjen Duyarsızlık Sendromu

Androjen reseptörüyle ilgili bozukluklar normal cinsel gelişimi etkileyerek, 46,XY kuruluşlu bireylerde androjen duyarsızlık sendromları olarak isimlendirilen bir dizi fenotipe yol açmaktadır. X'e bağlı kalıtım gözlenmektedir. Androjen duyarsızlık sendromunda testis fonksiyonu normaldir. Bu nedenle AR'deki bozukluğun derecesine göre klinik fenotip oluşmaktadır. Hastalarda testis boyutları normal olabilir. AMH sentez ve aktivitesi normal olduğundan müllerien yapılar rastlanmaz. Bu nedenle, çocukluk

çağında 5 α -redüktaz eksikliği veya 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (17 β -HSD) eksikliğinden klinik olarak ayırt edilmesi zordur. Pubertede androjen duyarsızlık sendromunda meme gelişiminin olması (telarş) ve virilizasyon eksikliği, diğer cinsiyet gelişim bozukluklarından ayırt edilmesini kolaylaştırmaktadır.

AR gen mutasyonları androjen duyarsızlık sendromunun en sık nedenidir.

2.4.1 Komplet Androjen Duyarsızlık Sendromu

Androjen duyarsızlık sendromunun en ağır formudur. KADS'de, 46,XY kromozom kuruluşuna sahip bir bireyde normal dişi dış genital yapı bulunmaktadır. Embriyogenezde, vajinanın proksimal kısmının AMH etkisiyle gerilemesi kısa ve kör vajinaya neden olmaktadır (58). Labial katlanmalar az gelişmiştir. Klitoris boyunda kısalık görülebilmektedir (59).

Testisler labia majör veya kasık bölgesinde bulunduğu palpasyon yoluyla tespit edilebilmektedir; ancak abdomen içi yerleşimde bu mümkün olmamaktadır. Çocukluk çağında, ultrasonografi (USG)'de veya cerrahi olarak yapılan incelemede müllerien yapıların hipoplazisi veya tam yokluğu ile beraber başta epididimis olmak üzere prostatın görülmemesi yol gösterici olmaktadır. Seminal vezikül ve vas deferens yapılarının görülmesi beklenmemektedir. Ancak bazen androjenlere doku duyarlılığı ile beraber testosteron seviyesinin yüksek olması *wolf* kanallarının gelişmesini ve farklılaşmasını tetiklemektedir (60). Gelişim sürecinde aksiller/inguinal kıllanmanın azlığı veya yokluğu ve normal meme gelişimi görülmektedir (33, 61).

Hannema ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, KADS tanılı bireylerin % 70'inde epididimis ve vas deferens yapılarına rastlanmıştır. Bu yapılar, testislerin oluşumu gerçekleşip, testosteron üretimi başladığında androjenlerin etkisiyle oluşmaktadır.

Androjenlere karşı düşük düzeydeki doku duyarlılığına, yüksek testosteron hormon seviyesinin eşlik etmesi, *wolf* kanalı gelişimine ve farklılaşmasına neden olmaktadır. Bazı yazarlar bu hastaların KADS yerine, ağır PADS olarak sınıflandırılmalarını önermektedir (62). KADS tanılı hastaların bazılarında prostat dokusuna rastlandığı bildirilmektedir (60).

Puberte dönemindeki ana bulgu KADS ve PADS hastalarının çoğunda feminizasyon görülmesidir. KADS'de meme gelişimi zamanında gerçekleşmektedir (63). Bu bireylerdeki önemli bir özellik seksüel kıllanmanın az olmasıdır. Bazı hastalarda seyrek bir şekilde kıllanma olduğu rapor edilmektedir; ancak *Tanner* evre 5 düzeyine hiçbir zaman ulaşamamaktadır (64).

Bu bireylerin cinsel yaşamları açısından normal kadınlarla kıyaslandığında bir fark taşımadıkları bildirilmiştir (58).

İnguinal hernisi olan kızların % 1,1'inde KADS ile karşılaşmıştır. KADS'de testiküler özellikler çoğunlukla kriptorşidizmdeki durum ile benzerlik göstermektedir. Testis torsiyonu, genellikle inmemiş testislerde tümör gelişmesi neticesinde oluşmaktadır. Çok nadir olarak testis tümörü ortaya çıkmadan da testis torsiyonu olduğu bildirilmiştir (65, 66).

2.4.2 Parsiyel Androjen Duyarsızlık Sendromu

Parsiyel androjen duyarsızlık sendromunda iki farklı fenotipten bahsedilmektedir. Dişi fenotipin baskın olduğu hastalarda dişi dış genital yapı, anogenital mesafenin uzaması, ürogenital sinüs, bazen klitoromegalinin eşlik ettiği pubik kıllanma, labiaların kısmi veya tam füzyonu ve kuşkulu genital yapı görülürken; erkek fenotipin baskın olduğu hastalarda mikropenis, perineal hipospadias ve kriptorşitizm görülmektedir (33). Erkek fenotipin egemen olduğu tablo, *Reifenstein* sendromu olarak da bilinmektedir (61).

PADS'de, pubertede feminizasyon ve virilizasyonun beraber

görüldüğü bir tablo vardır. Hastalarda fallus ve testislerde büyüme, seksüel kıllanma ve meme büyümesi olmaktadır. Hormon değerleri normal erişkinlerdeki referans değerlerde olsa bile, puberte gelişimi tam olmayabilir; ses kalınlaşması görülmeyebilir. Seyrek olarak akne görülebilmektedir (64).

Ko-regülatörlerin ADS patofizyolojisindeki rolü kesin olarak bilinmemektedir. Ancak bazı koaktivatör genleri açısından, *knockout* fare modellerinde farklı düzeylerde androjen duyarsızlığı olduğu gösterilmiştir. Erkek *SRC2 knockout* farelerde spermiyogenez defekti ve yaşa bağımlı olarak testiküler dejenerasyon gözlenmiştir (67). *FKBP52 knockout* farelerde penil hipospadias, prostat disgenezisi ve spermin fertilizasyon kabiliyetinde bozulma olduğu gösterilmiştir (67).

2.4.3 Hafif Androjen Duyarsızlık Sendromu

Hafif androjen duyarsızlık sendromuna sahip bireyler normal erkek dış ve iç genital yapısına sahiptir. Bu bireylerde, puberte döneminde meme büyümesi, seyrek vücut ve yüz kıllanması ve küçük penis görülebilir (51, 68). Bazı hastalarda sperm üretiminde bozukluk nedeniyle oligozoospermi ve azospermi görülebilir (69). Fertil olan hastalar da bildirilmiştir (70).

2.5 Androjen Duyarsızlık Sendromunda Fonksiyonel Özelliklerin Belirlenmesi

2.5.1 Genital Doku Hücrelerinde Androjen Reseptör Fonksiyonu

AR'nin klonlandığı 1979'dan önceki yıllarda, genital bölge cilt biyopsisinden elde edilen fibroblastlarda yapılan androjen bağlama analizleri, ADS tanısını konfirme etmede kullanılan önemli bir laboratuvar yöntemi olmuştur. Genital dokudan çoğaltılan fibroblastlarda radyoaktif olarak işaretlemiş androjen metiltrienolon

(R1881) gibi ligantlar kullanılarak saturasyon-bağlanma eğrileri ve *Scatchard plots* gibi yöntemlerle androjen bağlama kapasitesi ölçümleri yapılmıştır. Bağlama kapasitesinin (Bmax) düşük çıkması veya disosiyasyon sabitesinin yüksek çıkması, AR ekspresyonunun düşük olduğunu veya ligand bağlamada bozukluk olduğunu göstermektedir; ancak DNA'ya bağlanma yeteneği hakkında bilgi vermemektedir.

Günümüzde ADS tanısı moleküler genetik analiz ile konfirme edilmektedir; bunun yapılamadığı hastalarda genital bölge cildinden biyopsi alınarak biyokimyasal çalışmalar yapılmaktadır. ADS ile ilgili biyomarkırların araştırıldığı bir çalışmada, 46,XY normal erkekler ile 46,XY KADS tanısı olan hastaların labiyoskrotal bölgesinden alınan genital doku fibroblastlarında *microarray* yöntemiyle *genome-wide* gen ekspresyonu ve hücrelerin DHT'ye olan cevabı incelendiğinde; normal skrotal hücrelerin DHT uyarımı sonrasında apolipoprotein D (APOD)'ye ait messenger ribonükleik asit (mRNA) düzeylerinde artış görülürken, labium major kaynaklı fibroblastlarda aynı mRNA'da herhangi bir artış gözlenmediği bildirilmiştir. Bu çalışmada, APOD'un mutasyon tespit edilemeyen hastalar için yararlı bir marker olabileceği bildirilmiştir (71).

2.5.2 İn Vitro Transaktivasyon Testleri

AR genindeki belli bir mutasyonun protein üzerinde nasıl bir etkiye yol açtığı ortaya konabilir. Bu amaçla, raportör genle birlikte mutant AR'yi taşıyan ekspresyon vektörlerinin transfeksiyon ile aktarıldığı AR bulunmayan memeli hücre soyları kullanılmaktadır. Bu analiz yöntemi sayesinde, AR'nin hormon bağlama, nükleer transport, DNA'ya bağlanma ve transaktivasyon yeteneklerini değerlendirmek mümkün olmaktadır. AR fonksiyonunda bir bozukluk olması halinde raportör gen ekspresyonunda yaban tipe göre düşüklük görülmektedir. Fonksiyonel çalışmalarda KADS için yararlı bilgiler

elde edilirken; PADS veya hafif formda çoğunlukla bir sonuç elde edilememektedir.

2.5.3. N/C Etkileşim Testleri

Androjen reseptörüne hormon bağlanması, LBD'de bulunan heliks 12'de konformasyon değişikliği oluşturarak ligand bağlama cebinin fare kapanına benzer bir tarzda kapatılmasını sağlamaktadır. Böylece LBD yüzeyinde LXXLL veya FXXLF motifi içeren koaktivatörler için AF2 olarak isimlendirilen bağlanma oluğu meydana getirilmektedir (72). AF2, NTD'de bulunan ²³FQNLF²⁷motifi ile de inter/intramoleküler etkileşime girmektedir (73). N/C interaksyonu sayesinde heliks 12 ve bağlanmış olan androjen daha stabilize hale getirilmektedir (74). AF2'de meydana gelen mutasyonlar, reseptörün androjen bağlama yeteneğini etkilemeden ADS'ye neden olabilmektedir (75). Bu hastalardaki N/C etkileşimi, *mammalian two hybrid assay* yöntemiyle raportör gen aktivasyonuna bakılarak analiz edilebilir. Thompson ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, LBD'yi etkileyen yanlış anlamlı mutasyonların bulunduğu vakalarda yapılan fonksiyon analizlerinde, androjen bağlama kinetiğinin normale yakın olduğu; ancak N/C interaksyonunun bozulmasına bağlı olarak, etkileşim düzeyinde azalma olduğu ve ortaya çıkan ADS fenotipinin şiddetinin buna paralel olduğu bildirilmiştir (76). Az sayıdaki vakada bunun tam tersi bir durum görülmüştür; F826L mutasyonuna bağlı olarak ağır penoskrotal hipospadiası olan bir hastada yapılan fonksiyonel analizlerde, androjen bağlama yeteneğinin normal olduğu, ancak yaban tiple kıyaslandığında ilginç bir şekilde N/C interaksyon düzeyinde iki katlık bir artış bulunduğu saptanmıştır (77).

DBD içinde oluşan yanlış anlamlı mutasyonlar, AR'nin ARE'lere bağlanmasını tümünden bozarak veya AR-ARE etkileşiminde (78) afinite (affinity) ve seçicilikte (selectivity) değişikliğe neden olarak parsiyel

veya hafif ADS'lere neden olabilir. *Green fluorescent protein* (GFP) işaretli mutant ve yaban tip AR transfeksiyonu yapılmış hücrelerin, *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) (79) veya *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) gibi teknikler kullanılarak, reseptörün DNA'ya bağlanma yeteneğinin ortaya çıkarılması mümkündür (80).

2.6 Androjen Duyarsızlık Sendromunda Laboratuvar Bulguları

2.6.1 İlk 3 ay

Hipotalamus-hipofiz-gonad aksı, postnatal ilk birkaç ay boyunca aktif hale gelmektedir (minipuberte). Bu dönemde gonadotropin ve testosteron seviyeleri geçici bir süre pubertal düzeylerde bulunur. Zamanında doğmuş sağlıklı erkek bebeklerde testosteron konsantrasyonu, yaşamın ilk haftasından başlayıp 2. aya kadar süren bir artıştan sonra, tedricen düşüş göstererek 6. ay civarında prepubertal seviyelere dönmektedir (81). Plazma LH konsantrasyonu da testosteronu paralel olarak yaşamın ilk 3 ayı içinde sürekli bir yükselme göstererek, testosteronu hemen sonra prepubertal seviyelere inmektedir (81, 82). Bu fizyolojik testosteron piki yaşamın ilk 4-6. ayları arasında gonadotropik aksın değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gonadotropinler yaklaşık 2-3 yaşlarına kadar epizodik pikler gösterebilir (83).

Bu süreçte PADS'de LH ve testosteron düzeyleri normal veya yüksek olarak saptanabilir. Ancak KADS'de her iki hormon seviyesi de normalin altındadır. Bu durum geçici LH pikinin gerçekleşmesinde, prenatal dönemde hipotalamus hipofiz aksında androjen bağımlı bir mekanizmanın işlediğini gösteriyor olabilir (84). Follikül stimule edici hormon (FSH) seviyeleri her iki grupta da benzer sonuçlar vermektedir (85). Yenidoğan döneminde KADS hastalarında LH ve testosteron ile ilgili bilgi çok sınırlıdır. İzole vaka

raporlarında LH ve testosteron pikinin yenidoğan dönemindeki KADS hastalarında olmadığı bildirilmektedir (15). GnRH uyarı testi sonrası, PADS'de KADS'ye oranla daha fazla bir artış elde edilmektedir (85).

hCG uyarı testi, Leydig hücrelerinin testosteron biyosentez kapasitesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bouvattier ve ark. tarafından yapılan çalışmada hCG uyarı testi sonrasında KADS'de 5 kattan daha fazla artış tespit edilirken, PADS'de bu artış 2-3 kat olarak bildirilmiştir (85). Genellikle 2-3 katlık artışlar fizyolojik kabul edilmektedir (86).

Yaşamın ilk birkaç ayı içinde, serum testosteron ve DHT seviyeleri tespit edilebilir düzeye geldiğinde, T/DHT oranının normal değeri 12'nin altında beklenir. hCG uyarı testi sonrası 17 gün ile 6 ay arasındaki normal çocuklarda T/DHT oranı $5,2 \pm 1,5$ olarak saptanmaktadır (15).

2.6.2 Prepubertal Dönem

Prepubertal dönem çocuklarında LH'nin normal değeri 0,02-0,3 mIU/mL iken FSH'ninki 0,26-3 mIU/mL değerleri arasındadır. Ancak doğumda pubertal seviyede bulunan gonadotropinler, 2-3 yaşlarına kadar epizodik pikler gösterebilir. Goji ve Tanikaze tarafından prepubertal dönemdeki 8-10,7 yaş aralığındaki çocuklarda yapılan bir çalışmada, LH: 0,09-0,41 mIU/mL, FSH: 0,72-2,63 mIU/mL olarak tespit edilmiştir (87). Bir-10 yaş arasındaki prepubertal erkeklerde testosteronun normal değeri 10 ng/dL'nin altındadır (83).

Prepubertal dönemdeki hastalarda hCG uyarı testi sonrası T/DHT ölçümü yaygın olarak kullanılmaktadır (88). Normal bireylerde benzer protokoller ile yapılmış olan farklı çalışmalarda T/DHT oranları <11 (88), 1.5-17 (89), 6-16,8 (90) ve 11-31 (91) şeklinde sonuçlanmıştır.

2.6.3 Pubertal Dönem

Testisleri sağlam olan KADS hastalarında testosteron, normal erişkin erkek düzeylerinde (350-1030 ng/dL) veya yüksek saptanır. LH konsantrasyonu da artmış testosteron seviyesine rağmen normal erişkin erkek düzeylerinin (0,2-7 mIU/mL) üzerinde bulunur. FSH seviyesi normal (1,8-11,2 mIU/mL) veya hafif yüksek olabilir (92, 93). FSH seviyesi -muhtemelen inhibine bağlı olarak- daha değişken seyretmektedir.

Normal erkeklerde T/DHT oranı farklı çalışmalarda 9-19 (94), 30'un altında (91) olarak bildirilmiştir. Yaşamın ilk yılı ve puberte döneminde bazal veya uyarılmış T/DHT oranının 30'un üzerinde olması 5a-redüktaz tip II enzim eksikliği lehine bir bulgudur (91).

Estradiol periferde testosterondan dönüştürülmekte veya testisten salgılanmaktadır. KADS'de estradiol seviyesi normal kadınlardaki referans aralıkta (3.4-17 ng/dL) bulunur.

PADS'de gonadotropin ve steroid değerlerinin KADS ile benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (95).

Pubertede sekonder testiküler atrofi nedeniyle FSH seviyesi normal değerlerin üzerine çıkabilir. LH seviyesi normal veya yükselmiş olabilir. Bu değişikliklerin arkasından testosteron patlaması (surge) meydana gelmektedir; ancak bu yükselmenin maskülinizasyona herhangi bir katkısı olmamaktadır. Bütün bu laboratuvar değerleri ADS lehine değerlendirilebilecek bulgulardır.

2.7 Androjen Duyarsızlık Sendromunda Ayırıcı Tanı

İnfant ve çocuklarda ADS tanısı koymak zordur; bu nedenle altta yatan bir AR gen mutasyonunun araştırılması gerekmektedir. Ancak ADS ön tanısı olan her hastada AR gen mutasyonu tespit edilemez. Ahmed ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, 278 kişilik bir hasta serisinde klinik ve biyokimyasal olarak KADS ön tanısı olan bireylerin

çoğunda AR geninde mutasyon tespit edilirken; klinik bulguların daha hafif olduğu az sayıdaki hastada herhangi bir mutasyon saptanmamıştır (96).

Holterhus ve ark. tarafından ADS ön tanılı çocuklarda yapılan AR ekspresyonu ve mutasyon analizine yönelik bir araştırmada, hastalardan alınan genital doku fibroblastlarında androjen bağlama kapasitesi, transkripsiyon ve translasyon düzeylerinin tespiti ve dizi analizi çalışılmıştır. Komplet form ön tanısı olan hastalarda mutasyonların değişken (variable) trinükleotid tekrarlarının olduğu gen bölgesinde bulunduğu tespit edilmiştir. PADS tanısı olan bir bireyde ise transkripsiyon ve translasyon düzeyinde ciddi bir azalma olmasına rağmen herhangi bir moleküler genetik anormallik saptanmamıştır. Bu bulgular promoter değişikliklerinin androjen aktivitesinde bozukluğa neden olduğuna işaret etmektedir (55).

Steroidojenic faktör 1 (SF 1) mutasyonu taşıyan 46,XY karyotipe sahip iki çocukta müllerien yapılarına rastlanmazken; hCG uyarı testinde normal Leydig hücre cevabının alındığı bildirilmiştir. Adrenal yetmezliği bulunmayan bu hastalarda AR geninde herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir (97).

Çocukluk çağında klinik ve laboratuvar verileri spesifik olmadığı için ADS tanısına ulaşmanın kolay olmadığı anlaşılmaktadır.

2.8 Androjen Duyarsızlık Sendromunda Prenatal Tanı

ADS'de nadiren prenatal tanı konulmakla beraber, bunların çoğu rastlantısalıdır (98). Ultrasonografide tespit edilen cinsiyet ile sitogenetik incelemede bildirilen cinsiyet arasındaki tutarsızlık, KADS tanısını akla getirmektedir (99).

2.9 Androjen Duyarsızlık Sendromunda Tedavi

ADS tanısı olan hastaların puberte döneminde yapılacak tedaviler

açısından sahip oldukları iki seçenek vardır: 1. Hasta birey dişi yönde cinsiyet seçimi yaptığı takdirde, gonadektomi yapılır ve östrojen tedavisi verilir; 2. Erkek yönde bir cinsiyet seçimi olursa, virilizasyon yetersizliğinin üstesinden gelmek için ilave androjen tedavisi verilmesi gerekir. Bebeklik çağında erkek yönde cinsiyet seçimi yapılmış ise cerrahi rekonstrüksiyon öncesi fallik büyümeyi uyarmak amacıyla androjen tedavisi uygulanmaktadır.

Günümüzde, puberte başlangıcında seks steroid desteğiyle ilgili fikir birliğine varılarak hedefler belirlenmiştir; buna göre sekonder seks karakterleriyle birlikte seçilen cinsiyete uygun olarak pubertal matürasyonu tamamlamak, pubertal büyüme atağını uyarmak, optimal kemik mineralizasyonunu sağlamak ve cinsiyete uygun psikoseksüel olgunluğu yakalamak amaçlanmaktadır (100). Günümüzde, KADS tanısı olan hastaların gonadektomiden sonra siklik olmayan (non-cyclic) östrojen tedavisi alması standart olarak kabul görmektedir, ancak uterusu olmayan bir kadının progesteron kullanmasının yararı hakkında herhangi bir kanıt bulunmamaktadır. Bazı çalışmalarda KADS tanısı olan bireylere östrojen yerine testosteron verilmesinin libido artışı sağladığı, kas gücünü artırdığı ve hayat kalitesini yükselttiği kabul edilmekte; ancak bu tedavi seçeneğinin kontrollü çalışmalar yapılarak sonuçlarının daha iyi değerlendirilmesi gerektiği söylenmektedir (33).

PADS tanısı olan erkeklerde maskülinizasyona katkı sağlamak için zaten yüksek olan endojen testosterona ek olarak yüksek doz androjen tedavisi yapılmaktadır. Bu tedavilerin geri dönüşümü ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Weidemann ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, DBD içinde mutasyon taşıyan bir hastaya haftada bir kez kas içi 250 mgr *testosterone enanthate* tedavisi verilmiş ve hastanın virilizasyon düzeyinde belirgin ilerleme olduğu bildirilmiştir (101).

KADS'de inmemiş testislere bağlı olarak başta malign seminom olmak üzere neoplastik değişikliklere eğilim oluşmaktadır. Bu

nedenle hastalarda gonadektomi önerilmektedir. Kansere gelişme riskinin basit kriptorşitizm ile kıyaslandığında yüksek olup olmadığıyla ilgili bilgiler kesin değildir. Basit kriptorşitizmde kansere gelişme riski % 3 olarak bildirilmiştir (102). KADS’de malignite riski 15 yaşına doğru % 4 iken, 50 yaşına doğru bu risk % 33’e ulaşmaktadır. Buna göre; gonadal tümörlerin puberte öncesi gelişme olasılığı düşük olduğundan, gonadektomi adolesans sonrasına bırakılarak hastalarda normal pubertal başlangıç ve sekonder seks karakterlerinin oluşmasına fırsat verilmektedir; ancak *carcinoma in situ* veya malignite şüphesi durumunda puberteden önce testislerin çıkarılması gerekebilir (65, 103, 104).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada etik kurul onayı alındıktan sonra (EK-1); Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Endokrinolojisi ve Metabolizma Bilim Dalı ve Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Endokrinolojisi Kliniği'nde tanısı konulan ve takibi devam eden hastalardan alınan periferik kan örnekleri, onamları alınarak (EK-2) Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Laboratuvarında çalışılmıştır.

3.1 Olgular

Çalışmaya, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Endokrinolojisi ve Metabolizma Bilim Dalı ve Dr. Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Endokrinolojisi Kliniği'nde takip edilen parsiyel ve komplet form androjen reseptör duyarsızlığı ön tanılı hastalar dahil edilmiştir. Hasta seçim kriterleri Tablo 3.1'de gösterilmektedir. Bu kriterlerden ilk 3 bulguya sahip olup diğer bulgulardan bir veya daha fazlasını taşıyan hastalar çalışmaya davet edilmiştir. Hastaların klinik değerlendirmesinde daha detaylı evreleme yapmaya olanak sağladığı için *Prader* sınıflaması yerine *Sinnecker* sınıflaması kullanılmıştır (Tablo 3.2). Hastaların dış genital yapı fenotipleri, *Sinnecker* evresi ve pelvik USG bulguları Tablo 3.3'te gösterilmektedir. Gönüllülere 1'den 31'e kadar numaralar verilmiştir.

Tablo 3.1 Hasta Seçim Kriterleri

1. Karyotip kuruluşunun 46,XY olması		
2. Her iki gonadın testis yapısında olması		
3. Bazal ya da hCG ile uyarılmış testosteron düzeyinin normal ya da yüksek olması		
Uygun olan kutuyu işaretleyiniz		
	Hayır	Evet
Primer amenore	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kuşkulu genital yapı gösteren bireyler	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Genital fenotipte dişi yapı egemense: klitoromegali, fallus görünümü, palpasyonda gonad tespit edilmesi; erkek fenotip egemense: mikropenis, hipospadias, kordi varlığı, bifid skrotum görünümü	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
hCG stimülasyonu sonrası ölçülen T/DHT oranına göre, 5 α redüktaz tip 2 enzim bozukluğundan ayırıcı tanının yapılamadığı bireyler	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Tablo 3.2 *Sinnecker* Sınıflaması

Tip	Fenotip	Alt grup	Fenotip sonucu
1	Erkek	1a	Spermatogenezde bozulma
		1b	1a ve/veya pubertal virilizasyonda bozulma
2	Baskın olarak erkek	2a	İzole hipospadias
		2b	Mikropenis ve ağır hipospadias, bifit skrotum
3	Kuşkulu	3a	Klitoris benzeri glansa sahip mikrofallus, labia major benzeri bifit skrotum, perineoskrotal hipospadias
		3b	3a gibi; ek olarak kısa, kör vajinanın bulunduğu ürogenital sinüs
4	Baskın olarak dişi	4a	Klitoromegali ve labial füzyon, giriş gölgesi geniş, kısa ve kör vajinanın bulunduğu ürogenital sinüs
		4b	Hafif derecede androjenik etkiler: hafif klitoromegali veya kısmi labial füzyon, üretra ve vajina girişleri ayrılmış
5	Dişi	5a	Puberte döneminde sekonder dişi cinsiyet karakterleri gelişmiştir (meme, seyrek pubik ve/veya aksiller kıllanma); virilizasyon etkisine rastlanmaz (klitoromegali, ses kalınlaşması, hirsutizm)
		5b	5a gibi; ancak androjenik etki görülmez (pubik ve/veya aksiller kıllanma)

Tablo 3.3 Hastaların Dış Genital Yapısı, *Sinnecker* Evresi, Pelvik USG Bulguları ve Fenotipi

Hasta	Dış Genital Yapı	<i>Sinnecker</i> evresi	Pelvik USG	Fenotip
1	<ul style="list-style-type: none">• Perineoskrotal hipospadias	2a	<ul style="list-style-type: none">• Sağ gonad yerleşimi: inguinal bölge; internal orifis düzeyinde• Sol gonad yerleşimi: skrotum• Seminal vezikül• Duktus deferens• Epididimis• Prostat	PADS
2	<ul style="list-style-type: none">• Mikropenis• Kordi• Perineal hipospadias• Penil <i>shawl</i>• Bifit skrotum• Skrotal kıvrım• Labial skrotalizasyon	2b-3	<ul style="list-style-type: none">• İnguinal yerleşimli gonadlar• Epididimis• <i>Wolf</i> kanalı ekleri	PADS
3		5	2006: gonadektomi 2007: vajinoplasti	KADS
4	<ul style="list-style-type: none">• Mikropenis• Kordi +/-• Penoskrotal hipospadias• Skrotal kıvrım	2b	<ul style="list-style-type: none">• Bilateral abdominal yerleşimli nodüler hipoekoik yapılar, milimetrik ekojeniteler	PADS
5	<ul style="list-style-type: none">• Penoskrotal hipospadias• Bifit skrotum• Skrotal kıvrım• Kordi	2b	<ul style="list-style-type: none">• Skrotal yerleşimli gonadlar• Epididimis• Prostat	PADS
6	<ul style="list-style-type: none">• Penoskrotal hipospadias• Bifit skrotum• Skrotal kıvrım• Kordi	2b	<ul style="list-style-type: none">• İnguinal yerleşimli gonadlar• Epididimis	PADS
7	<ul style="list-style-type: none">• Vajina• Labial kıvrım	5	<ul style="list-style-type: none">• İnguinal yerleşimli gonadlar	KADS

Tablo 3.3-devam

Hasta	Dış Genital Yapı	Sinnecker evresi	Pelvik USG	Fenotip	
8	<ul style="list-style-type: none">• Mikropenis• Perineal hipospadias• Bifit skrotum• Kordi	3a	<ul style="list-style-type: none">• İnguinal yerleşimli gonadlar• Seminal vezikül• Prostat	PADS	
9	<ul style="list-style-type: none">• Klitoromegali• Fallus• Vajina açıklığı ve ürogenital sinüs• Labia minör ve majör füzyonu	4a	<ul style="list-style-type: none">• İnguinal yerleşimli gonadlar	PADS	
10	<ul style="list-style-type: none">• Vajina• Labial kıvrım• Labia minör ve majör füzyonu	5	<ul style="list-style-type: none">• Sağ gonad yerleşimi: intraabdominal• Sol gonad yerleşimi: sol inguinal kanalın distali	KADS	
11	<ul style="list-style-type: none">• Mikropenis• Kordi• Glanduler hipospadias• Bifit skrotum• Skrotal kıvrım	3	<ul style="list-style-type: none">• Skrotal yerleşimli gonadlar• Seminal vezikül• Epididimis	PADS	
12	<ul style="list-style-type: none">• Kordi• Glanduler hipospadias• Bifit skrotum• Skrotal kıvrım• Penil <i>shawl</i>	2b	<ul style="list-style-type: none">• Skrotal yerleşimli gonadlar• Seminal vezikül• Epididimis	PADS	
13	Hasta bilgilerine erişilememiştir.				
14	Operasyon öncesi	?	2b-3a	<ul style="list-style-type: none">• Gonad yerleşimi?• <i>Wolf</i> kanalı ekleri• Prostat	PADS
14	Operasyon sonrası	<ul style="list-style-type: none">• Mikropenis• Kordi• Perineoskrotal hipospadias• Bifit skrotum• Skrotal kıvrım	2b	<ul style="list-style-type: none">• Skrotal yerleşimli gonadlar• <i>Wolf</i> kanalı ekleri• Prostat	

Tablo 3.3-devam

Hasta	Dış Genital Yapı	Sinnecker evresi	Pelvik USG	Fenotip
15	<ul style="list-style-type: none">• Mikropenis• Kordi• Perineal hipospadias• Bifit skrotum• Skrotal kıvrım	2b	<ul style="list-style-type: none">• Skrotal yerleşimli gonadlar• Seminal vezikül• Epididimis	PADS
16	<ul style="list-style-type: none">• Ürogenital açıklık tek	3a	<ul style="list-style-type: none">• İnguinal yerleşimli gonadlar	PADS
17	<ul style="list-style-type: none">• Ürogenital açıklık tek	3a		PADS
18	<ul style="list-style-type: none">• Vajina• Fallus• Hipospadias	3a	<ul style="list-style-type: none">• İnguinal yerleşimli gonadlar• Seminal vezikül• Spermatik kordon• İmmatür testis	PADS
19	<ul style="list-style-type: none">• Klitoromegali• Üretra ve vajina açıklıkları ayrı	4b	<ul style="list-style-type: none">• İnguinal yerleşimli gonadlar• Epididimis	PADS
20	<ul style="list-style-type: none">• Glanduler hipospadias	2a	<ul style="list-style-type: none">•	PADS
21	<ul style="list-style-type: none">• Mikropenis• Kordi• Penoskrotal hipospadias• Skrotumda hiperpigmentasyon	2	<ul style="list-style-type: none">• Sol gonad yerleşimi: skrotum• Sağ gonad yerleşimi: intraabdominal• Seminal vezikül	PADS
22	Hasta bilgilerine erişilememiştir.			
23	<ul style="list-style-type: none">• Klitoromegali• Fallus• Tek açıklık	3	<ul style="list-style-type: none">• İnguinal yerleşimli gonadlar• Epididimis	PADS
24	<ul style="list-style-type: none">• Kordi• Perineoskrotal hipospadias• Bifit skrotum	2b	<ul style="list-style-type: none">• Skrotal yerleşimli gonadlar• Wolf kanalı ekleri• Prostat	PADS

Tablo 3.3-devam

Hasta	Dış Genital Yapı	Sinnecker evresi	Pelvik USG	Fenotip
25	<ul style="list-style-type: none">• Vajina• Labial kıvrım	5	<ul style="list-style-type: none">• Sağ gonad yerleşimi: ameliyat edilmiş• Sol gonad yerleşimi: intraabdominal	KADS
26	Hasta bilgilerine erişilememiştir.			
27	<ul style="list-style-type: none">• Proksimal penis yerleşimli hipospadias• Testisler palpabl; skrotal yerleşimli	2a		PADS
28	<ul style="list-style-type: none">• Glanduler hipospadias• Kordi	2b	<ul style="list-style-type: none">• Skrotal yerleşimli gonadlar	PADS
29	<ul style="list-style-type: none">• Mikropenis• Kordi• Perineal hipospadias• Bifit skrotum• Penil <i>shawl</i>• Klitoromegali• Fallus• Labia major füzyonu	3b	<ul style="list-style-type: none">• İnguinal yerleşimli gonadlar• Epididimis	PADS
30	<ul style="list-style-type: none">• Klitoromegali	4b	<ul style="list-style-type: none">• İnguinal yerleşimli gonadlar• Epididimis• Spermatik kordon	PADS
31	<ul style="list-style-type: none">• Klitoromegali• Fallus	4b	<ul style="list-style-type: none">• İnguinal yerleşimli gonadlar• Spermatik kordon	PADS

3.2 Yöntem

3.2.1 Kullanılan Cihazlar

- *MagNA Pure LC 2.0 (Roche Applied Science)*
- *Mastercycler Gradient (Eppendorf)*
- *Microcomputer Electrophoresis Power Supply E452 (Consort, Belgium)*
- *Elektroforez tankı (Clever Scientific Ltd.)*
- *Gel Logic 200 Imaging System (Kodak)*
- *Autovortex Mixer SA2 (Stuart Scientific)*
- *M-240 R (BOECO Germany)*
- *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*

3.2.2. Kullanılan Kimyasallar

- AR genine özgü primer çiftleri
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- 5x TBE
- 1x TBE
- *Tris base*
- Borik asit
- EDTA
- NaOH tablet
- *Ethidium Bromide*
- 6x yükleme tamponu
- Bromfenol mavisi
- Ksilen siyanol
- Gliserol
- *50 bp DNA Step Ladder (Promega)*
- *Sephadex® G-50 medium (Sigma-Aldrich)*

- *HOT FIREPol® DNA Polymerase (Solis BioDyne)*
- *Buffer B1/B2 (Solis BioDyne)*
- MgCl₂
- DMSO
- Agaroz
- *ExoSAP-IT (GML)*
- *ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction mix (Applied Biosystems)*
- Formamid

3.2.3 Solüsyonların Hazırlanması

- dNTP miks çalışma solüsyonu: 100 mM'lık dATP, dCTP, dGTP, dTTP solüsyonlarının her birinden 50 µL alınarak 25 mM'lık bir karışım hazırlanmıştır. 25 mM'lık karışımdan alınan 20 µL, 80 µL steril distile su ile karıştırılarak 5mM konsantrasyonda çalışma solüsyonu elde edilmiştir. - 20°C'de saklanmıştır.
- 5x TBE (1 L): 54 gr *Tris base*, 27,5 gr Borik asit ve 20 mL 0,5 mM EDTA karıştırılarak dH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır. + 4 °C'de saklanmıştır.
- 1x TBE: 5x TBE solüsyonu 1:4 oranında dH₂O sulandırılarak elde edilmiştir. + 4 °C'de saklanmıştır.
- 0,5 M EDTA (100 mL): 18,61 gr EDTA ve 2 gr NaOH tableti, 80 mL distile su içinde çözülmüştür. pH 8,0 yapılarak dH₂O ile hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. + 4 °C'de saklanmıştır.
- *Ethidium Bromide* (10 mL): 100 mgr *Ethidium Bromide*, 10 mL distile su içinde vorteks ile karıştırılmıştır. Alüminyum folyo ile sarılarak + 4 °C'de saklanmıştır.
- 6x yükleme tamponu: 0,025 gr bromfenol mavisi, 0,025 gr ksilen siyanol ve 0,3 mL gliserol karıştırılarak dH₂O ile 1 mL'ye tamamlanmıştır.

- Sefadeks: 14 mL steril distile suya, 1 gr *Sephadex*[®] G-50 *medium* (*Sigma-Aldrich*) eklenerek karıştırılmıştır. Yeni hazırlanan sefadeks, ilk kullanımdan önce 30 dakika bekletilmiştir. + 4 °C'de saklanmıştır.

3.2.4 Test Protokolleri

3.2.5 DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu, hastalardan alınan periferik kandaki lenfositlerinden, *MagNA Pure LC 2.0* cihazı kullanılarak otomatik olarak yapılmıştır.

3.2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

AR genine ait 8 ekzon, intron-ekzon birleşme (*junction*) bölgelerini kapsayacak şekilde uygun primerler kullanılarak çoğaltılmıştır (105). Bir numaralı ekzon için 4 farklı primer çifti kullanılmıştır. Primer dizileri ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonrası elde edilen ürün uzunlukları Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

3.2.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kimyasal Karışımları

AR geni ekzon 1 A-D fragmanları ve ekzon 2-8'in çoğaltılmasında *HOT FIREPol*[®] *DNA Polymerase* kullanılmıştır. PZR'de kullanılan kimyasalların miktarları Tablo 3.5'de gösterilmiştir.

3.2.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları

AR geni ekzon 1 A ve D fragmanları için *touchdown* (TD) PZR yapılmıştır. TD PZR'de uygulanan sıcaklık ve süreler Tablo 3.6'da gösterilmiştir. AR ekzon 1 B, C fragmanları ve ekzon 2-8'in

çoğaltılmasında uygulanan sıcaklık ve süreler Tablo 3.7’de gösterilmiştir.

Tablo 3.4 PZR’de Kullanılan Primer Dizileri

Primer adı	Primer nükleotit dizisi	Ürün uzunluğu
Ekzon 1A-F	AAGAGAAGGGGAGGCGGGGTAAG	521-584
Ekzon 1A-R	CAACGTGGATGGGGCAGCTGAG	
Ekzon 1B-F	CCCGAGAGAGGTTGCGTCCC	592
Ekzon 1B-R	TCGCCTTCTAGCCCTTTGGTG	
Ekzon 1C-F	AGCTTCGGGGGATTGCATGTA	739
Ekzon 1C-R	GCCGCCAGGGTACCACACATC	
Ekzon 1D-F	CCGCTTCCTCATCCTGGCACAC	617-668
Ekzon1D-R	TCTGAAGGTGGCCCGTGCAATAG	
Ekzon 2F	AATGCTGAAGACCTGAGACT	318
Ekzon 2R	AAAATCCTGGGCCCTGAAAG	
Ekzon 3F	CTAGAAATACCCGAAGAAAG	257
Ekzon 3R	GAGAGACTAGAAAATGAGGG	
Ekzon 4F	GTGATTTTCTTAGCTAGGGC	424
Ekzon 4R	ATCCCCCTTATCTCATGCTC	
Ekzon 5F	GCTTTTCCCCACCACCCTTAAT	527
Ekzon 5R	TTGGGTGTGAAAGGGGTGGTCTC	
Ekzon 6F	CCAGCAGGAGAAACAGCAAGC	378
Ekzon 6R	GGGGAATGAAGAAGGGAAATGTC	
Ekzon 7F	AGGCCCCAAGCACACAGACT	516
Ekzon 7R	CCTCCACCCCTTTCACAATATC	
Ekzon 8F	GCCACCTCCTTGTC AACCT	289
Ekzon 8R	AGAGGAGTAGTGCAGAGTTA	

Tablo 3.5 1A-D Fragmanları ve Ekzon 2-8'in Çoğaltılmasında Kullanılan Kimyasal Karışım

Kimyasal	Hacim (µl)	Son konsantrasyon
<i>HOT FIREPol</i> [®] (5 U/µL)	0,25	0,05 U/ µl
<i>Buffer B1/B2</i> (10x)	2,5	1x
25 mM MgCl ₂ (25mM)	1,5-2	1,5-2 mM
dNTP miks (5 mM)	1	200 µM
<i>Forward primer</i> (10 pmol/µL)	0,25	0,1 µM
<i>Reverse primer</i> (10 pmol/µL)	0,25	0,1 µM
DMSO	2,3 (ekzon 1 A ve D fragmanları için)	
DNA		4 ng/ µL
H ₂ O	25 µL'ye tamamlanır	
Toplam	25	

Tablo 3.6 1 A ve D Fragmanlarının Çoğaltılmasında Uygulanan TD PZR Koşulları

	Sıcaklık	Süre
1	95 °C	15 dakika
2	95 °C	1 dakika
3	64 °C	1 dakika
	-0,5	
4	72 °C	1 dakika
	2→4: 10 döngü	
5	95 °C	1 dakika
6	59 °C	1 dakika
7	72 °C	1 dakika
	5→7	
	1A: 22 döngü	
	1B: 30 döngü	
8	72 °C	10 dakika
9	8 °C	∞

Tablo 3.7 1 B, C Fragmanları ve Ekzon 2-8'in Çoğaltılmasında Uygulanan PZR Koşulları

	Sıcaklık	Süre¹
1	95 °C	15 dakika
2	95 °C	45 saniye
3	60 °C	45 saniye
4	72 °C	45 saniye
	2→4: 30 döngü	
5	72 °C	10 dakika
6	8 °C	∞

3.2.9 Jel Elektroforezi

% 2'lik jel hazırlamak için 30 mL 1x Tris/Borat/EDTA (TBE) içine 0,6 gr agaroz eklenmiştir. Çözelti mikrodalga fırında orta (*medium*) ayarda 1,5 dakika ısıtılarak, eriyen jel içine 0,5 µl *ethidium bromide* eklenerek karıştırılmıştır. Jel, elektroforez aparatına dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Elektroforez tankı 1x TBE ile doldurularak jel yürütme işlemine hazır hale getirilmiştir.

PZR sonrası 5 µl PZR ürünü, 1 µl 6x yükleme tamponu ile karıştırılıp, karışımın 5 µl'si agaroz jele yüklenmiştir. 90 volt (V)'da 30 dakika elektroforez uygulanmıştır. Jel, *Kodak Gel 200* cihazında görüntülenerek, *Kodak 1D Image Analysis Software (Rochester, New York)* kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen bantların boyları, *50 bp DNA Step Ladder (Promega)* kullanılarak kontrol edilmiştir.

¹ 1C fragmanının çoğaltılması için uygulanan denatürasyon, *anneal* ve elongasyon süresi 1 dakikadır.

3.2.10 PZR Sonrası Temizleme

PZR sonrası temizleme işlemi için, *ExoSAP-IT* (GML) enzimatik temizleme ürünü kullanılmıştır. Protokol doğrultusunda 5 µL PZR ürünü, 2 µl *ExoSAP-IT* reaktifiyle karıştırılmıştır. Karışım 37 °C' de 15 dakika; 80 °C'de 15 dakika inkübasyona tabi tutularak temizleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.11 Sekans Reaksiyonu

PZR ürünleri temizlendikten sonra sekans reaksiyonu için hazırlanan kimyasal karışım ve sekans reaksiyonunda uygulanan sıcaklık ve süreler tablo 3.8 ve tablo 3.9'da gösterilmektedir.

Tablo 3.8 Sekans Reaksiyonunda Kullanılan Kimyasal Karışım

Kimyasal	Hacim (µL)
<i>ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction mix (Applied Biosystems)</i>	: 1
<i>Forward, reverse</i> (1 pmol/ µL)	: 2
Kalıp	: 10-20 ng
Su	: 10 µL'ye tamamlanır
Toplam hacim	: 10

Tablo 3.9 Sekans Reaksiyonunda Uygulanan Sıcaklık ve Süreler

	Sıcaklık	Süre
1	96 °C	: 1 dakika
2	96 °C	: 10 saniye
3	50 °C	: 5 saniye
4	60 °C	: 4 dakika
	2→4: 25 döngü	
5	4 °C	: ∞

3.2.12 Sekans Reaksiyonu Sonrası PZR Ürünü Temizleme

Spin kolonlara 650 µL sefadeks aktarılarak 5200 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolonlar temiz ve numaralandırılmış yeni tüplere yerleştirilip, sekans reaksiyonu sonrası elde edilen 10 µL'lik PZR ürünleri, spin kolonlardaki sefadeksin orta kısmını bırakılmıştır. Spin kolonlar, 5200 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek ürün temizleme işlemi tamamlanmıştır.

3.2.13 Dizi Analizi

Dizi analizi, *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer* cihazı kullanılarak yapılmıştır. Temizlenen 10 µL'lik PZR ürünleri, 10 µL formamid ile beraber *96-Well Plate* üzerindeki kuyulara bırakılarak karıştırılmıştır. *Plate* bileşenleri doğru bir şekilde bir araya getirilerek *autosampler* üzerinde B pozisyonuna yerleştirilmiştir. *UltraSeq36_POP7 run module* ve *3130POP7_BDTv3-KB-Denovo-v5.2* analiz protokolü kullanılarak elektroforez gerçekleştirilmiştir. Mutasyon değerlendirmesi için *SeqScape version 2.7* ve *Sequencing Analysis version 5.1 (Windows® XP ve 2000)* yazılımları kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamıza Ankara ve diğer illerimizden PADS ve KADS ön tanılı 31 gönüllü birey dahil edilmiştir. Hastalara ait tüm klinik bilgiler, ilk başvuru tarihleri baz alınarak takip edildikleri hastanelerdeki dosyalarından elde edilmiştir.

Hastaların ilk başvuru tarihindeki takvim yaşı, kemik yaşı, aile öyküsü, başvuru nedeni ve *Tanner Marshall* sınıflandırmasına göre meme gelişim evresi Tablo 4.1'de gösterilmektedir. Hastaların hormonal değerlendirmesi, 0-3 ay, prepubertal ve puberte dönemlerine göre ayrılarak yapılmıştır.

Yapılan çalışmaya PADS ön tanısı olan 24, KADS ön tanısı olan 4 hasta dahil edilmiştir. Üç, 13, 17, 20, 22 ve 26 numaralı olguların klinik bilgilerine erişilememiştir.

4.1 Parsiyel Androjen Duyarsızlık Sendromu Ön Tanılı Hasta Grubu

Ortalama başvuru yaşı 3 (6 gün-13^{8/12} yaş) olarak hesaplanmıştır. Yirmi bir hasta prepubertal dönemde olup; 3 hasta pubertal dönemdedir. PADS ön tanılı hastaların en sık başvuru sebebi kuşkulu genital yapı olarak kaydedilmiştir. Kemik yaşı bakılan 4 hastada herhangi bir anormallik kaydedilmemiştir. Pubertal dönemde başvuran hastalardan olgu 19 ve olgu 23'de meme gelişimi saptanırken (sırasıyla *Tanner* evre 2 ve 3), olgu 18'de meme gelişiminin tam olmadığı gözlenmiştir (*Tanner* evre 1) (Tablo 4.1).

4.2 Komplet Androjen Duyarsızlık Sendromu Ön Tanılı Hasta Grubu

KADS ön tanısı ile çalışmaya dahil edilen olgu 3, olgu 7, olgu 10 ve olgu 25'in yaşları sırayla 16^{4/12} 1^{10/12}, 14 ve 10^{5/12} olarak

kaydedilmiştir. Olgu 7 ve 25'de inguinal herni; olgu 10'da adet görememe ve meme gelişiminin olmaması (*Tanner* evre 1) ilk başvuru şikayeti olmuştur. (Tablo 4.1).

4.3 Hormon Ölçümler

4.3.1 Parsiyel Androjen Duyarsızlık Sendromu Ön Tanılı Hastalar

Prepubertal dönemde başvuran hastalardan olgu 4'te LH seviyesi pubertal referans aralığa göre normal, FSH seviyesi yüksek; olgu 21'de ise her iki gonadotropin seviyesinin de referans değerlerin üzerinde olduğu gözlenmiştir. Prepubertal dönemde başvuran diğer olgularda saptanan gonadotropin seviyeleri aynı yaş gurubundaki sağlıklı erkek bireylerin referans değerleri ile uyumlu bulunmuştur (Tablo 4.2).

Pubertal dönemde başvuran 3 hastanın (olgu 18, olgu 19, olgu 23) gonadotropin seviyeleri, referans değerlerin üzerinde saptanmıştır (Tablo 4.2).

On bir hastada bazal, 7 hastada hCG uyarı testi sonrası T/DHT oranı hesaplanmıştır. Dört hastada bazal ve hCG uyarı testi sonrası T/DHT oranı birlikte değerlendirilmiştir (Tablo 4.2).

4.3.2 Komplet Androjen Duyarsızlık Sendromu Ön Tanılı Hastalar

Prepubertal dönemde başvuran olgu 7 ve olgu 25'in gonadotropin seviyeleri kendi yaşlarının referans değerleri ile uyumlu saptanmıştır (Tablo 4.2). Pubertal dönemde başvuran olgu 10'da LH yüksek; FSH normal aralıkta bulunmuştur. Olgu 3'e ait hormonal veriler elde edilememiştir (Tablo 4.2).

Olgu 7 ve 25'de hCG uyarı testi sonrası T/DHT oranı hesaplanmıştır (Tablo 4.2).

4.4 Mutasyon Analizi

Androjen reseptör geninde yapılan dizi analizinde (Resim 4.1), olgu 2 ve olgu 25'de ekzon 4'te, olgu 7'de ise ekzon 1'de androjen reseptöründe değişikliğe neden olan yanlış anlamlı mutasyon saptanırken (Tablo 4.3); olgu 8'de ekzon 1 ve 7'de, olgu 16'da ise ekzon 1'de androjen reseptöründe herhangi bir değişiklik oluşturmayan sessiz mutasyon saptanmıştır. Olgu 8 ve olgu 16'da saptanan ekzon 1'deki değişikliğin aynı olduğu izlenmiştir (Tablo 4.4). CAG tekrar sayıları 19-22; GGC tekrar sayıları 17-22 arasında bulunmuştur.

Tablo 4.1 İlk Başvurudaki Takvim Yaşı, Kemik Yaşı, Aile Öyküsü, Başvuru Nedeni ve Meme Gelişim Evresi

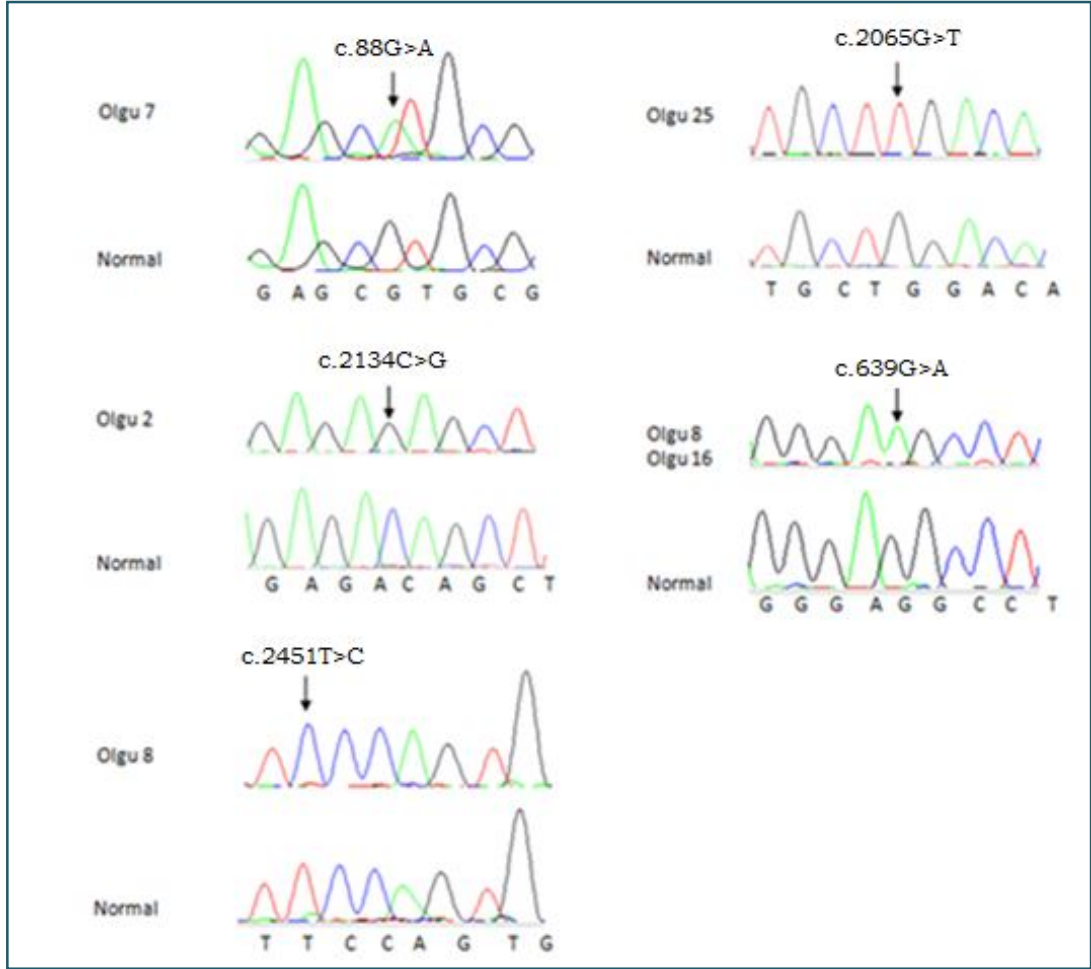
Hasta	Takvim yaşı	Kemik yaşı	Aile öyküsü	Başvuru nedeni	Meme gelişim evresi
1	2 ^{2/12}	2 yıl	Yok	Hipospadias	
2	2 ^{8/12}		Yok	Kuşkulu genital yapı	
3	16 ^{4/12}		Kardeşinde benzer öykü		4
4	8 ay		Yok	Kuşkulu genital yapı	
5	3 ay		Yok	Hipospadias, bift skrotum	
6	2 ^{7/12}		Yok	Hipospadias	
7	1 ^{10/12}		Yok	Bilateral inguinal herni	
8	3 ^{3/12}	2,5-3 yıl	Yok	Kuşkulu genital yapı	
9	5 ^{5/12}		Yok	Bilateral inguinal herni	
10	14		Yok	Adet görememe, meme gelişiminin olmaması	1
11	57 gün		Yok	Kuşkulu genital yapı	
12	1 ^{5/12}	1 ^{6/12} yıl	Yok	Kuşkulu genital yapı	
13					
14	3 ^{4/12}		Yok	Kuşkulu genital yapı	
15	9 ay		Yok	Hipospadias	
16	2 ^{4/12}		Yok	Bilateral inguinal herni	
17					
18	13 ^{8/12}	13 ^{9/12} yıl	Yok	Ses kalınlaşması, adet görememe	1
19	13		Yok	Adet görememe, tüylenme	2
20					
21	6 gün		Yok	Kuşkulu genital yapı	
22					
23	12 ^{10/12}		Yok	Adet görememe, tüylenme	3
24	6 ^{5/12}		Yok	Kuşkulu genital yapı	
25	10 ^{5/12}	10 yıl	Yok	Sağ inguinal herni	1
26					
27	39 hafta			Hipospadias	
28	27 gün		Yok	Kuşkulu genital yapı, hipospadias	
29	10 ay		Yok	Kuşkulu genital yapı	
30	2		Yok	Kuşkulu genital yapı	
31	5 ^{2/12}		Yok	Kuşkulu genital yapı	

Tablo 4.2 Hormon Ölçümleri

Hasta	Yaş	bLH (mIU/mL)	bFSH (mIU/mL)	bT (ng/dL)	bDHT (ng/dL)	uLH (mIU/mL)	uFSH (mIU/mL)	uT (ng/dL)	uDHT (ng/dL)	Estradiol (pg/mL)	bT/bDHT	uT/uDHT
1	22/12	0,36	2,87	19,94		9,2	9,9					
2	28/12	0,6	0,98	<20				1. gün: 158 4. gün: 114		<20		
	10	0,45		67,84	8	0,45		1. gün: 210,8 4. gün: 166	1. gün: 12 4. gün: 7		8,48	1. gün: 17,56 4. gün: 23,71
3	16 ⁴ /12											
4	8 ay	4,91	31,62	52,66	6			104,7	6		8,77	17,45
5	3 ay	2,96	2,31	72,5	23						3,15	
6	27/12	0,65	1,95	<10				1. gün: 275,9 4. gün: 270,8	1. gün: 32,8 4. gün: 43,6			1. gün: 8,41 4. gün: 6,21
7	1 ¹⁰ /12	2,22	0,94	57,6				264	30			8,8
8	3 ³ /12			<20				532				
9	5 ⁵ /12	<0,1	1,17					1. gün: 129,6 4. gün: 161,8	4. gün: 114,64	10,14		1. gün: 4. gün: 14,1
10	14	18,82	9,22	15,72				<10				
11	57 gün	3,02	2,7	270	28,4						9,5	
12	1 ⁵ /12	0,49	0,05	10				1. gün: 135 4. gün: 216,9		7,6		
13												
14	3 ⁴ /12	<1	0,6	<2	3,34			1. gün: 84,75 4. gün: 82,09	1. gün: 112,58 4. gün: 114,29	15	0,6	1. gün: 0,75 4. gün: 0,7

Tablo 4.2-devam

Hasta	Yaş	bLH (mIU/mL)	bFSH (mIU/mL)	bT (ng/dL)	bDHT (ng/dL)	uLH (mIU/mL)	uFSH (mIU/mL)	uT (ng/dL)	uDHT (ng/dL)	Estradiol (pg/mL)	bT/bDHT	uT/uDHT
15	9 ay	0,1	0,655	2	0,05			251,2	55		4	4,56
16	2 ^{4/12}	<0,2	<1	6,8				260,9	44,3			5,9
17												
18	13 ^{8/12}	7,75	35,4	615	46,8						13,1	
19	13	22,6	28,7	403,9	19					31,2	21,2	
20												
21	6 gün	22,38	24,3	99,12						29,03		
22												
23	12 ^{10/12}	7,6	19,5	186	21,5					33,4	8,65	
24	6 ^{5/12}	0,99	1,3	7,5				140,3				
25	10 ^{5/12}	<0,1	0,592					1. gün: 195,6 4.gün: 102,8	1. gün: 52,75 4. gün: 81,93	<5		1.gün: 3,7 4. gün: 1,25
26												
27	39 hafta	5,42	2,28	163,3	55						2,97	
28	27 gün	1,4	3	158	14,9						10,6	
29	10 ay			<20				352				
30	2											
31	5 ^{2/12}											



Resim 4.1 Tek baz değişikliği saptanan hastaların dizi analizi görüntüleri.

Tablo 4.3 Androjen Reseptöründe Değişikliğe Neden Olan Mutasyonlar

Hasta	Ekzon	Domain	CAG tekrarı	GGC tekrarı	Mutasyon ²	Mutasyon tipi	Aminoasit değişimi	Kodon numarası	Fenotip
2	4	LBD	20	17	c.2134C>G	Baz değişimi	Q→E	712	PADS
7	1	NTD	22	20	c.88G>A	Baz değişimi	V→M	30	KADS
25	4	LBD	22	18	c.2065G>T	Baz değişimi	G→stop	689	KADS

Tablo 4.4 Androjen Reseptöründe Değişikliğe Neden Olmayan Sessiz Mutasyonlar

Hasta	Ekzon	Domain	CAG tekrarı	GGC tekrarı	Mutasyon ²	Mutasyon tipi	Aminoasit	Kodon numarası	Fenotip
8	1	NTD	21	17	c.639G>A	Baz değişimi	E→E	213	PADS
8	7	LBD	21	17	c.2451T>C	Baz değişimi	I→I	817	PADS
16	1	NTD	19	22	c.639G>A	Baz değişimi	E→E	213	PADS

² NCBI NM_000044.2 referans dizisi baz alınarak, *complementary* DNA'ya göre numara verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Androjen reseptörü herhangi bir ligand ile etkileşime girmediği durumda, sitoplazmada şaperonlara bağlanarak ligand bağlanmasına uygun bir konformasyonda beklemektedir (106). Androjen bağlanması durumunda; androjen reseptörü konformasyon değişikliğine uğrar, şaperondan ayrılır, dimerizasyon meydana gelir ve nükleusa göç ederek (107, 108) koaktivatör proteinlerin AF2'ye bağlanması gerçekleşir (109). RNA polimeraz 2 ve diğer faktörlerin de katılımıyla fonksiyonel transkripsiyon kompleksi meydana gelmektedir. AF2, transkripsiyon aktivitesinin ortaya çıkmasında merkezi bir rol oynamaktadır.

Androjen reseptör geni mutasyonları en sık görülen 46,XY CGB nedenidir. Var olan mutasyonun tipine bağlı olarak farklı fenotipler ile karşılaşılmaktadır.

ADS'de fenotip, reseptör üzerinde oluşan hasar düzeyine bağlıdır. En hafif formunda normal dış genital yapıya sahip bir erkekte, hafif virilizasyon defekti ile beraber bazen spermatogenezde bozulma görülebilir. En ağır formunda ise hasta birey normal dış genital yapıya sahiptir (110).

Etkilenmiş bir birey sahip olduğu mutasyonu sağlıklı taşıyıcı bir anneden kalıtım yoluyla veya *de novo* olarak kazanmış olabilir. *de novo* mutasyon iki şekilde ortaya çıkmaktadır: 1. Annenin germ hücresi mozaikliğine sahip olması, 2. Zigot oluşumundan sonra meydana gelen somatik mutasyon. Sadece klinik değerlendirme yapılarak elde edilecek bulgular ile ailelere genetik danışmanlık vermek mümkün değildir. Bu nedenle, moleküler genetik analiz yöntemleri kullanılarak mutasyon incelemesi yapılmalıdır. AR geninin protein kodlayan dizisinin herhangi bir yerinde mutasyon görülme olasılığı bulunmaktadır.

Belli bir mutasyonun sebep olduğu fenotip aynı aile içinde bile klinik farklılık göstermektedir (96). Bu durum, prenatal dönemde tanı

koymayı ve cinsiyet seçiminde karar verme sürecini zorlaştırmaktadır. Belli bir kodonu etkileyen aynı veya farklı mutasyonlar ve bunların AR üzerinde sebep olduğu aminoasit değişiklikleri ile ortaya çıkardıkları fenotiplerin bilinmesi, bilgi birikimini artırarak hastalarda genetik danışmanlık sürecini kolaylaştıracaktır.

AR'de meydana gelen aminoasit değişikliğinin korunmuş bir pozisyonda yer alması ve aminoasitlerin kimyasal özellikleri ortaya çıkacak fenotipin ağırlığıyla doğrudan ilişkilidir.

Kızlarda inguinal herni, KADS ile ilişkili olabilmektedir. İnguinal herni şikayetiyle incelenen kızların % 1-2'sinde AR geninde mutasyona rastlanmaktadır (111). Bizim çalışmamızda KADS ön tanısı ile çalışmaya dahil edilen, mutant AR genine sahip olgu 7 ve olgu 25'de ilk başvuru şikayetleri bilateral ve unilateral inguinal herni olarak kaydedilmiştir. İnguinal herni ile başvuran kızlara mutlaka karyotip analizi önerilmelidir. Karyotip sonucunun cinsiyet ile uyumsuz olması halinde, AR geninde mutasyon taraması yapılmalıdır (112).

Çalışmamızda, ADS ön tanısına sahip hastaların büyük kısmında mutasyona rastlanmamıştır. Bu durum cinsiyet gelişim bozukluğu etyolojisinde genetik heterojenitenin fazla olduğunu göstermektedir.

Olgu 2

PADS ön tanısıyla takip edilen olgu 2'nin ilk olarak 28^{8/12} yaşında kuşkulu genital yapı nedeniyle incelemeye alındığı görülmektedir. Hastanın dış genital fenotipi *Sinnecker* evre 2b-3a ile uyumludur. USG incelemesinde *wolf* kanalı eklerine rastlanmıştır (Tablo 3.3).

Biyokimyasal incelemede gonadotropin ve testosteron seviyelerinin prepubertal dönemdeki referans aralığında olduğu gözlenmiştir. Hasta, 10 yaşında biyokimyasal olarak tekrar

incelendiğinde, LH ve testosteron seviyesinin *Tanner* evre 2 referans aralığında (0,2-4,9 mIU/mL) olduğu saptanmıştır. Bazal T/DHT oranı 8,48; hCG uyarı testi sonrası elde edilen T/DHT oranı ise 17,56 ve 23,71 olarak sonuçlanmıştır. Olgu 2'deki biyokimyasal bulgular ADS ön tanısıyla uyumaktadır (Tablo 4.2).

Olguda yapılan dizi analizinde cDNA'da 2134. pozisyonda C→G değişimi (c.2134C>G) bulunmuştur. Bu değişiklik 712. kodonda CAG>GAG değişimine bağlı olarak proteinde Q→E'ye yol açmıştır. ADS'ye neden olan mutasyonların çoğu LBD'yi kodlayan dizide meydana gelmektedir (84, 113). Sadece ekzon 4'de bildirilmiş değişimlere bakıldığında bunların, hastaların 1/3'ünde parsiyel, 2/3'ünde komplet fenotipe neden olduğu görülmektedir. Bizim hastamızın fenotipi parsiyel olarak ortaya çıkmıştır.

Q711E değişimi, bizim vakamız dışında iki defa bildirilmiştir. Lumbroso ve ark. tarafından bildirilen vakayla ilgili sınırlı bilgilere, ARDB'den ulaşılmıştır. Parsiyel fenotipe sahip olan bu hastanın Bmax değeri çok düşük saptanmış ve kız olarak büyütüldüğü bildirilmiştir. Chávez ve ark. tarafından sunulan diğer hastanın fenotipi de parsiyel olarak ortaya çıkmış ve aile çocuklarını kız olarak büyütülmüştür. Ancak bu vakada diğerinden farklı olarak Bmax değerinin normal olduğu bildirilmiştir (114).

Olgu 2'de fenotipin parsiyel olarak ortaya çıkması AR'de bir miktar rezidüel aktivitenin bulunmasının sonucudur. Androjen reseptöründe meydana gelen fonksiyon bozukluğunun düzeyi, aminoasit değişiminin proteinde yol açtığı fiziksel farklılığın derecesi ile orantılıdır. Bu nedenle ilk olarak, herhangi bir aminoasit değişiminin bir protein üzerinde meydana getirdiği hasar düzeyinin tahmin edilmesinde kullanılan programlardan faydalanılmıştır. *SIFT Blink* (115) ile yapılan incelemede Q711E değişikliğinin proteinde ciddi fonksiyon bozukluğuna neden olabileceği öngörülmüştür. Bu sonucu teyit etmek amacıyla *PolyPhen-2* (116) programı ile yapılan incelemede de aynı sonuç elde edilmiştir.

Bir proteinde belli bir pozisyondaki aminoasit değişiminin meydana getirebileceği hasar düzeyinin tahmin edilmesinin bir yolu da aynı proteinin farklı türler arasındaki homolojisinin araştırılmasıdır. Androjen reseptörü için memelilerde yapılan homoloji incelemesinde; gln711 rezidüsünü de içeren geniş bir dizinin iyi korunmuş olduğu görülmektedir (Şekil 5.1). AR, GR, MR ve PR bir nükleer reseptör üst familyasının dördüncü üyesidir. AR bu reseptörler ile karşılaştırıldığında; gln711 rezidüsünün iyi korunduğu, ancak komşuluğundaki aminoasit rezidülerinin aynı derecede korunmadığı izlenmiştir (Şekil 5.2). Bu bulgular ışığında söz konusu aminoasit değişiminin işlev bozukluğu oluşturabileceği yorumu yapılabilir. Hastanın parsiyel fenotipe sahip olması mutant proteinin rezidüel aktiviteye sahip olduğunu düşündürmektedir.

İnsan	Invleaepegvvcaghdnnqpdsfaallssinelger	q	lvhvkwakalpgfrnlhvddqmaıqyswmgımvfam
Domuz	Invleaepegvvcaghdnnqpdsfaallssinelger	q	lvhvkwakalpgfrnlhvddqmaıqyswmgımvfam
At	Invleaepegvvcaghdnnqpdsfaallssinelger	q	lvhvkwakalpgfrnlhvddqmaıqyswmgımvfam
Dev panda	Invleaepegvvcaghdnnqpdsfaallssinelger	q	lvhvkwakalpgfrnlhvddqmaıqyswmgımvfam
Sığır	Invleaepegvvcaghdnnqpdsfaallssinelger	q	lvhvkwakalpgfrnlhvddqmaıqyswmgımvfam
Köpek	Invleaepegvvcaghdnnqpdsfaallssinelger	q	lvhvkwakalpgfrnlhvddqmaıqyswmgımvfam
Benekli sırtlan	Invleaepegvvcaghdnnqpdsfaallssinelger	q	lvhvkwakalpgfrnlhvddqmaıqyswmgımvfam
Sıçan	Invleaepegvvcaghdnnqpdsfaallssinelger	q	lvhvkwakalpgfrnlhvddqmaıqyswmgımvfam
Fare	Invleaepegvvcaghdnnqpdsfaallssinelger	q	lvhvkwakalpgfrnlhvddqmaıqyswmgımvfam

Şekil 5.1 Memelilerde AR LBD aminoasit dizilimi. AR LBD içindeki 75 aminoasit rezidüsünden oluşan bir dizinin diğer memeli türleriyle homoloji yönünden incelenmesi. Dikdörtgen içindeki q rezidüsü, olgu 2’de mutasyona uğramıştır.

540	EPEVLYAGYDSSVPDSTW-----RIMTTLNMLGGF	Q	IAAVKWAKAIPGFRNLHDDQM	593	GR
746	EPEIVYAGYDSSKPDTAE-----NLLSTLNRLAGK	Q	MIQVVKWAKVLPGFKNLPLEDQI	799	MR
695	EPDVIYAGHDNTKPDTS-----SLLTSLNQLGER	Q	LLSVVWWSKSLPGFRNLHIDDQI	748	PR
681	EPGVVCAGHDNNQPSFA-----ALLSSLNELGER	Q	LVHVVKWAKALPGFRNLHVDDQM	734	AR

Şekil 5.2 İnsan nükleer reseptörlerinin homoloji yönünden incelenmesi. Dikdörtgen içine alınan Q rezidüsü, olgu 2’de mutasyona uğramıştır.

LBD üzerinde meydana gelen mutasyonlar, ligandın reseptöre bağlanmasını bozarak; bazı durumlarda da ligand bağlama fonksiyonu normal olmasına rağmen reseptör transaktivasyonunun bozulmasına neden olarak virilizasyon kusuru ortaya çıkarmaktadır. Bunun nedeni belli bir mutasyonun reseptör dimerizasyonunu veya bu bölgelere bağlanan ko-modülatörlerin etkileşimlerini engellemesi olabilir (117).

LBD üzerinde bulunan, agonist molekülün bağlanmasıyla stabilize edilen AF2, türler arasında çok iyi korunmuş hidrofobik bir yüzeye sahiptir. AF2, SRC/p160 koaktivatör bağlanmasında görevli olan yapıdır. AF2, 3, 4 ve 12 numaralı helikslerden oluşmaktadır ve komşuluğunda zıt yüklü aminoasit rezidüleri bulunmaktadır (118). Androjenlerin AR'ye bağlanmasıyla birlikte AF2 heliks 12 stabilize edilerek koaktivatör bağlama yüzeyi uygun hale getirilmektedir (119). AR, diğer nükleer reseptörlerden farklı olarak AR AF2 LXXLL motifleri taşıyan proteinleri bağlamaktadır.

AF2 ayrıca, NTD'de bulunan ²³FQNLF²⁷ (FXXLF) motifiyle de androjen bağımlı olarak spesifik bir etkileşim kurar. Bu şekilde N/C etkileşimi (74), reseptör dimerizasyonu (120) ve androjen bağımlı genlerin kontrolüne giden bir süreç başlatılmaktadır (121).

Literatürde bildirilen bazı mutasyonlar, androjen bağlama aktivitesinde herhangi bir azalma oluşturmadan, FXXLF motifiyle etkileşimi bozarak ADS'ye neden olmaktadır. Olgu 2'de mutasyona uğrayan gln711, AF2 yapısındaki hidrofobik oluğu (cleft) oluşturan aminoasit rezidülerinden (L712, V716, V730, M734, I737) (122) biri olmamakla birlikte; hidrofobik oluğun hemen yanında yer almaktadır. AF2 içindeki mutasyonlar komplet veya komplet forma yakın fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (123). Olgu 2'de mutasyonun AF2 içinde olmaması, rezidüel protein aktivitesinin varlığı ile ilişkili olabilir. Söz konusu değişikliğin hidrofobik oluğun hemen yanında bulunması, olgu 2'de fenotipin parsiyel olarak ortaya çıkmasıyla ilişkilendirilebilir. Belli bir aminoasit değişiminin yol açtığı

hasarı kesin olarak ortaya koyabilmek için androjen bağlama çalışmaları yapmak gerekmektedir.

Sharma ve ark. tarafından yapılan çalışmada, K (lizin) Asetiltransferaz 7 (HBO1)'nin AR ile etkileşimi incelenmiştir. HBO1 testis ve prostatta eksprese edilen bir proteindir. Ligand bağımlı yoldan AR LBD ile etkileşime girerek transkripsiyonu baskılamaktadır; ancak bu kontrolün normal bir şekilde yapılabilmesi için DBD ve LBD'nin intakt olması zorunludur (124). Söz konusu çalışmada deneysel olarak tek bir aminoasit değişikliğinin AR-HBO1 etkileşimini nasıl etkileyeceği araştırılmamış olsa da, literatüre göre bazı aminoasit rezidüleri ko-regülatörler ile etkileşimde kritik öneme sahip olabilmektedir (125).

LBD üzerindeki aminoasit değişimleri, reseptörün bir miktar rezidüel aktivite gösterebilmesine bağlı olarak, *nonsense* ve *frameshift* mutasyonlara göre daha az virilizasyon defekti oluşturmaktadır. Bu nedenle KADS olarak takip edilen bazı hastalarda bile *wolf* kanalı türevlerine rastlamak mümkündür (62). Olgu 2'de parsiyel virilizasyon kaybıyla ilişkili olarak dış genital fenotipin kuşkulu olması; iç genital fenotipte de *wolf* kanalı türevlerine rastlanması, reseptörün rezidüel aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Proteinde meydana gelen aminoasit değişimine bakıldığında, her iki aminoasidin de polar özellikte olduğu görülmektedir. Söz konusu aminoasitlerin polaritesinin benzer olması, protein içindeki fiziksel dinamiklerin fazla etkilenmediğine işaret edebilir. Bu durumda proteinin steroid bağlama yeteneği bir miktar korunuyor olabilir.

Q711E değişiminin, daha önce bildirilen iki vakada ve bizim olgumuzda parsiyel fenotip ortaya çıkardığı görülmektedir (41, 114). Bu durumda, söz konusu değişimin genotip-fenotip korelasyonu açısından PADS'a neden olduğu söylenebilir.

Olgu 7

KADS ön tanısıyla takip edilen olgu 7'nin ilk olarak 22 aylıkken bilateral inguinal herni şikayetiyle incelemeye alındığı ve fenotipinde vajina ile labial kıvrıma sahip olduğu görülmektedir. Olgunun dış genital fenotipi *Sinnecker* evre 5'e uymaktadır (Tablo 3.3).

Biyokimyasal incelemede gonadotropin ve testosteron seviyelerinin prepubertal dönemdeki referans aralıkta olduğu gözlenmiştir. hCG uyarı testi sonrası elde edilen T/DHT oranı 8,8 olarak sonuçlanmıştır. Olgu 7'deki biyokimyasal bulgular ADS ön tanısıyla uyumaktadır (Tablo 4.2).

Olguda yapılan dizi analizinde 450GTG>ATG değişimi saptanmıştır. Bu mutasyon, NTD'de V30M değişimine neden olmaktadır. *Androgen Receptor Gene Mutations Database* (ARDB) (41) ve diğer veritabanlarında (*NCBI, HGMD, 1000 genomes, UCSC, Ensembl*) yapılan taramada bu değişimin daha önce bildirilmediği görülmüştür.

Homoloji yönünden yapılan incelemede val30 ve komşuluğundaki aminoasit rezidülerinin memelilerde iyi korunduğu, ancak nükleer reseptörlerde korunmuş bir rezidü olmadığı izlenmiştir. *SIFT Blink* (115) ve *PolyPhen-2* (116) ile yapılan tahminde, V30M değişiminin yüksek bir skor verdiği görülmektedir. Bu nedenle ağır bir mutasyon olabileceği yorumu yapılabilir.

Protein üzerinde meydana gelen bu değişim, AR NTD'de bulunan FXXLF motifi olarak adlandırılan ²³FQNLF²⁷ aminoasit dizisinin hemen yakınında yer almaktadır. FXXLF motifi AF2 ile etkileşim kuran primer androjen bağımlı etkileşim bölgesi olarak kabul edilmektedir. FXXLF motifi aynı domaindeki WXXLF motifiyle (⁴³³WHTLF⁴³⁷) birlikte AR LBD üzerinde değişik bölgeler ile etkileşim kurarak, hormon-reseptör kompleksinin stabilize edilmesini sağlamaktadır. He ve ark. tarafından yapılan deneysel çalışmada, bu motifleri içeren dizinin silinmesi veya bu motifler içindeki

aminoasitlerde oluşturulan mutasyonların N/C etkileşimini ve disosiyasyon kinetiğini bozdukları, ancak motif dışındaki ilk aminoasit olan gln28 değişikliğinin patolojik bir sonuç doğurmadığı görülmektedir (73). Benzer şekilde, gln28 ve bu motife yakınlığı nedeniyle val30'daki herhangi bir değişimin de deneysel olarak N/C etkileşiminde bir bozukluğa neden olmayacağı öngörülebilir. Ancak deneysel olarak oluşturulan mutasyonların *in vivo* karşılığı farklı olabilir.

Olgu 25

KADS ön tanısıyla takip edilen olgu 25'in, ilk olarak 10^{5/12} yaşında sağ inguinal herni şikayetiyle incelemeye alındığı, fenotipinde vajina ve labial kıvrıma sahip olduğu görülmektedir. Hastanın dış genital fenotipi *Sinnecker* evre 5 ile uyumludur. Olguda, sağ gonadın inguinal herni nedeniyle yapılan operasyonda alınmış olduğu; sol gonadın ise USG incelemesinde abdomen içinde yerleştiği görülmektedir (Tablo 3.3).

Biyokimyasal incelemede gonadotropinlerin prepubertal düzeylerde olduğu gözlenmektedir. hCG uyarı testi sonrası elde edilen T/DHT oranları 3,7 ve 1,25 olarak sonuçlanmıştır (Tablo 4.2).

Olguda yapılan dizi analizinde 2424GGA→TGA değişimi saptanmıştır. Bu mutasyona bağlı olarak gly688, zincir sonlandırma kodonuna (UGA) dönüşmektedir. Olguda saptanan bu *nonsense* mutasyon, protein trunkasyonuna neden olarak AR LBD'nin tamamına yakınının kaybıyla sonuçlanmaktadır. *Nonsense* mutasyonların neden olduğu ADS'de değişken ekspresyon görülmemektedir; bu mutasyonların tamamına yakını KADS'ye neden olmaktadır (62). Söz konusu mutasyon, Ahmed ve ark. tarafından komplet formda fenotipe sahip bir hastada daha önce bildirilmiş olup; androjen bağlama kapasitesini tamamen ortadan kaldırmaktadır (96).

Sessiz Mutasyonlar

AR geninde bu güne kadar yaklaşık 40 tane sessiz mutasyon bildirilmiştir (43). Bizim çalışmamızda olgu 8 ve olgu 16'da aminoasit değişikliğine yol açmayan sessiz mutasyonlar tespit edilmiştir.

Olgu 8 ve olgu 16'da saptanan 995GAG→GAA (E211E) değişimi, ADS tanısına sahip birkaç hastada (126) ve bazı infertil erkeklerde (127) AR geninde yapılan dizi analizinde saptanan tek değişiklik olarak bildirilmiştir. Gottlieb ve ark. tarafından yapılan diğer bir çalışmada E211E değişimine sahip bir bireyde AR ve mRNA düzeylerinin çok düşük olduğu gözlenmiştir (128). 'Open reading frame'deki bazı sessiz mutasyonların *aberrant splicinge* neden olarak ADS'ye neden olduğu bilinmektedir (47). E211E değişimine sahip hastaların çoğunda AR ve mRNA düzeylerinin çalışılmadığı dikkat çekmektedir.

Normal popülasyonda 995GAG→GAA (rs6152) değişimine % 8 oranında rastlandığı ve bu değişimin StuI kesim bölgesini değiştirdiği bilinmektedir (129, 130). Hindistan veya Orta Doğu halklarında ise % 10-15'lik sıklıklarda karşılaşılmaktadır (127). Bu nedenle söz konusu değişiminin tek başına bir etkisinin olacağını söylemek yanıltıcı olabilir.

Olgu 8'de ayrıca 2810ATT→ATC (I816I) değişimi saptanmıştır. Bu da aminoasit değişimine yol açmayan bir transizyondur. ARDB (41) ve diğer *SNP* veritabanlarında yapılan taramada bu değişikliğin daha önce bildirilmediği görülmüştür.

Bizim çalışmamızda mutasyon tespit edilen hasta sayısı literatüre göre düşük kalmıştır (31 hastanın 3'ünde). Bunun bir nedeni çalışmaya katılan hastalardan komplet formda fenotipe sahip olanların az sayıda olması (KADS: 4, PADS: 24) olabilir. KADS'de mutasyon tespit etme olasılığı, PADS ile kıyaslandığında daha yüksektir (41).

ADS, X'e bağlı kalıtım modeli gösteren bir hastalıktır. Çalışmamızda sadece 12 hastadan pedigri bilgisi elde edilebildi. Pedigri analizinde olguların hepsi de sporadik olarak izlenmiştir. Sadece olgu 3'n aile öyküsünden benzer fenotipe sahip bir kardeşi olduğu öğrenilmiştir. X'e bağlı kalıtım özelliğinin izlendiği hastalarda mutasyon saptama olasılığı artabilir (94). Özellikle PADS'de genetik heterojeniteye bağlı olarak benzer fenotipe yol açabilecek durumlar olması nedeniyle, pedigri analizinin X'e bağlı kalıtım özelliği göstermemesi mutasyon saptama oranını düşürmektedir (96).

Postpubertal hastalarda jinekomasti bulunması PADS lehine bir bulgu olarak ele alınabilir (94). Bizim alışmamızda, PADS n tanısına sahip 3 hasta pubertal dönemdeydi ve bunlardan ikisinde (olgu 19 ve olgu 29) jinekomasti bulgusu kaydedilmişti. Ancak bu hastalarda AR geninde mutasyon saptanmadı.

Yaptığımız çalışmada hasta popülasyonunun büyük bir kısmı PADS n tanısı olan ve en sık kuşkulu genital yapı şikayetiyle başvuran prepubertal dönemdeki çocuklardan oluşmuştur. Prepubertal dönemde değerlendirilen olgu 4 ve olgu 21'de LH ve FSH seviyelerinin puberte düzeylerinin de üzerinde saptanması parsiyel androjen duyarsızlığında karşılaşılabilecek bir bulgudur (85). Prepubertal dönemde değerlendirilen diğer olgularda gonadotropin seviyeleri normal saptanmıştır. Puberte döneminde değerlendirilen olgu 18, olgu 19 ve olgu 23'de LH ve FSH seviyeleri puberte düzeylerinin üzerinde saptanmış olup, bu bulgu parsiyel androjen duyarsızlığı ile uyulmaktadır. Ancak Q711E değişimine sahip olan olgu 2 dışında diğer olgularda AR geninde mutasyon saptanmamış olması- klinik ve laboratuvar bulguları dikkate alındığında- CGB etyolojisindeki heterojeniteyi göstermektedir.

hCG uyarı testi sonrası T/DHT oranının yükselmesi 5a-redüktaz tip II enzim eksikliği lehine olsa da, beklenen yükselmenin olmaması bu tanıyı dışlamaz (131). Özellikle parsiyel enzim eksikliklerinde, yaş ve enzim eksikliğinin derecesine bağlı olarak T/DHT oranındaki

beklenen yükselme görülmeyebilir; hatta normal değerler elde edilebilir (132). Hiort ve ark. tarafından prepubertal dönemdeki hastalarda yapılan bir çalışmada, hCG uyarı testi sonrası elde edilen T/DHT oranlarının klasik formdan farklı olarak, kısmi enzim eksikliğinde hafif düzeyde arttığı gösterilmiştir (88). Bizim çalışmamıza dahil edilen olgularda bazal ve/veya hCG uyarı testi sonrası elde edilen T/DHT oranlarının heterojenite gösterdiği izlenmektedir. Bu durum hasta seçiminde hormonal profilin her zaman ADS lehine olamayacağını gösterir (94). Ayrıca, bazal ve hCG uyarı testinin birlikte değerlendirildiği hastalardan olgu 2’de T/DHT oranının 8,48 den 23,71’e; olgu 4’te ise 8,77’den 17,45’e yükseldiği gözlenmektedir. Olgu 2’de mutasyon saptanırken olgu 4’te saptanmamıştır. Yine bu durum hCG uyarı testi sonrası elde edilen T/DHT oranlarının PADS ve 5a-redüktaz tip II enzim eksikliğinin parsiyel olduğu hastalarda örtüşebildiğini göstermektedir.

KADS ön tanısı ile başvuran olgulardan 2’sinde mutasyon saptanmamıştır. Bu hastaların KADS olmadıklarını kesin olarak söyleyebilmek için promoter bölgesini de mutasyon varlığı açısından taramak gerekebilir. PADS ön tanılı hastaların çoğunda mutasyon saptanmamış olması genetik heterojenitenin bir sonucu olup; androjen reseptörüyle etkileşimde bulunan ko-regülatörlerle ilgili mutasyonlar, benzer fenotiplere neden olabilmektedir.

6. SONUÇLAR

Androjen reseptör geninde dizi analizi yapılan 31 bireyden oluşan hasta grubunda, 24 olguda PADS ön tanısı, 4 olguda KADS ön tanısı bulunmakta olup, 3 hastanın klinik bilgisine erişilememiştir. Çoğu prepubertal dönemde olan PADS ön tanılı olguların en sık kuşkulu genital yapı nedeniyle; KADS ön tanılı olguların ise inguinal herni ve adet görememe şikayetiyle başvuruda buldukları gözlenmiştir.

Olgularımızın gonadotropin ve steroid seviyelerinin androjen duyarsızlığı ön tanısı ile uyduğu görülmüştür. Ancak uyarılmış T/DHT oranı çalışılan olgulardan bazılarının değerleri, 5a-redüktaz tip 2 enziminin kısmi eksikliğinde elde edilebilecek değerler ile örtüşmektedir.

PADS ön tanısı olan 24 hastadan 1'inde (% 4) mutasyon saptanmış olması genetik heterojeniteyi göstermektedir. KADS ön tanısı olan 4 hastadan 2'sinde (% 50) androjen reseptöründe değişikliğe neden olan mutasyon saptanmıştır.

V30M değişimi ilk defa bizim çalışmamızda bildirilmiş olup, proteinde korunmuş bir bölgeyi etkilemektedir. Olgumuzda komplet androjen duyarsızlığına neden olmuştur.

G688X değişimi reseptörü tamamen işlevsiz bir hale getirerek komplet androjen duyarsızlığına neden olmaktadır.

Q711E değişimi genotip-fenotip korelasyonunda parsiyel androjen duyarsızlığına yol açmaktadır. Söz konusu değişim proteinde korunmuş bir bölgeyi etkilemesine rağmen, reseptörün rezidüel aktiviteye sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda, AR'de aminoasit değişikliği oluşturmayan 2 adet sessiz mutasyon saptanmıştır. E211E daha önce tanımlanmıştır. I816I ilk defa bu çalışmada bildirilmektedir.

Olgu 2'de uyarılmış T/DHT oranı yüksek çıkmasına rağmen, hastada mutasyon tespit edilmiş olması kesin tanıda moleküler genetik analiz yapılmasının gerekliliğini göstermektedir.

ÖZET

46,XY Kromozom Kuruluşlu Cinsel Gelişim Bozukluğu Gösteren Bireylerde Androjen Reseptör Gen Değişikliklerinin Araştırılması

Androjen reseptör gen mutasyonları, farklı derecelerde reseptör hasarına neden olarak, androjen üretimi ve metabolizması normal, 46,XY karyotipe sahip bireylerde farklı ağırlıktaki fenotiplerin ortaya çıkmasından sorumludur.

Komplet androjen duyarsızlığında sadece fenotipik özelliklere ve laboratuvar bulgularına bakarak tanı konulabilir; ancak parsiyel androjen duyarsızlığı, fenotipik özellikleri ve laboratuvar bulguları açısından, başta 5a-redüktaz tip 2 enziminin kısmi eksikliği olmak üzere, genetik nedenli birçok hastalık tarafından taklit edilebilir. Bizim çalışmamızda, çoğu parsiyel androjen duyarsızlığı ön tanısına sahip bir hasta grubunda androjen reseptör geninde direkt dizileme analizi yöntemiyle mutasyon taraması yapılmıştır.

Çalışmamıza ADS ön tanısı olan 31 hasta katılmıştır. Hastaların başvuru yaşı, nedeni ve fenotipik özelliklerine ait bilgiler hasta dosyalarından elde edilmiştir. Periferik kan lenfositlerinden yapılan DNA izolasyonu sonrası, androjen reseptör geninde kodlama yapan dizi *junction* bölgelerini kapsayacak şekilde dizayn edilen primerler yardımıyla çoğaltıldıktan sonra dizi analizi yapılmıştır.

Androjen reseptör geninde yapılan dizi analizinde, parsiyel androjen duyarsızlığı ön tanısı olan 24 hastadan 1'inde Q711E değişimi; komplet androjen duyarsızlığı ön tanısı olan 4 hastadan 1'inde V30M değişimi, diğer hastada ise protein trunkasyonuna neden olan G688X değişikliği saptanmıştır.

G688X ve Q711E, literatürde daha önce bildirilmiş olup olgularımız ile aynı fenotipe neden oldukları gözlenmiştir. Söz konusu mutasyonlar genotip-fenotip ilişkisinin daha kesin bir şekilde ortaya konmasına katkı sağlamıştır. V30M, ilk defa bizim çalışmamızda bildirilmektedir. V30M, NTD'de iyi korunmuş bir bölgeyi etkilemesi nedeniyle komplet androjen duyarsızlığına yol açmış olabilir.

ADS'de dış genital yapı fenotipi ve laboratuvar bulguları ön tanıyı destekleyebilir, ancak kesin tanı için moleküler genetik analiz yapılması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: androjen reseptörü, 46,XY cinsiyet gelişim bozukluğu, androjen duyarsızlık sendromu, dizi analizi, aminoasit değişimi.

SUMMARY

Detection of Androgen Receptor Gene Alterations in Subjects with 46,XY Disorders of Sex Development

Androgen receptor gene mutations are responsible for varying degrees of severity of phenotypes in 46,XY subjects with normal androgen biosynthesis and metabolism

Complete androgen insensitivity syndrome (CAIS) can be diagnosed by evaluating phenotypic features and laboratory findings solely; whereas many other genetic diseases-particularly 5 α -reductase type 2 deficiency- may mimic partial androgen insensitivity syndrome (PAIS), with respect to phenotypic features and laboratory findings. In this study, we detected androgen receptor gene alterations in a group of patients who were prediagnosed as partial androgen insensitivity by using direct sequencing analysis.

In our study, 31 subjects were included. The data about the age of patients, cause of admission and phenotypic features were obtained from hospital records. Following DNA isolation from peripheral blood lymphocytes and PCR amplification of androgen receptor gene open reading frame with appropriate primer pairs comprising exon/intron junctions, we directly sequenced the amplicons.

In direct sequence analysis of androgen receptor gene, we detected Q711E substitution in 1 out of 24 patients suspected with PAIS. Out of 4 patients prediagnosed as CAIS, one revealed a V30M substitution and another revealed a G688X alteration causing protein truncation.

G688X and Q711E with similar phenotypes in our cases had been reported before. These mutations contribute to reveal genotype-phenotype correlation more precisely. V30M is reported for the first time in our study. It is considered that this mutation resulted in complete phenotype by altering a highly conserved amino acid residue in NTD.

External genitalia phenotype and laboratory findings may point out androgen insensitivity syndrome, however, final diagnosis depends on molecular genetic analysis.

Key Words: androgen receptor, 46,XY disorders of sex development, androgen insensitivity syndrome, sequence analysis, amino acid substitution.

KAYNAKLAR

1. Wisniewski AB, Mazur T. 46,XY DSD with Female or Ambiguous External Genitalia at Birth due to Androgen Insensitivity Syndrome, 5alpha-Reductase-2 Deficiency, or 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Deficiency: A Review of Quality of Life Outcomes. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2009; 2009: 567430.
2. Bertelloni S, Scaramuzzo RT, Parrini D, Baldinotti F, Tumini S, Ghirri P. Early diagnosis of 5alpha-reductase deficiency in newborns. *Sex Dev.* 2007; 1: 147-151.
3. Hiort O, Sinnecker GH, Holterhus PM, Nitsche EM, Kruse K. The clinical and molecular spectrum of androgen insensitivity syndromes. *Am J Med Genet.* 1996; 63: 218-222.
4. Hanley NA, Ball SG, Clement-Jones M, Hagan DM, Strachan T, Lindsay S, Robson S, Ostrer H, Parker KL, Wilson DI. Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech Dev.* 1999; 87: 175-180.
5. Kobayashi A, Shawlot W, Kania A, Behringer RR. Requirement of Lim1 for female reproductive tract development. *Development.* 2004; 131: 539-549.
6. Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S. Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development.* 1997; 124: 1653-1664.
7. Ottolenghi C, Moreira-Filho C, Mendonca BB, Barbieri M, Fellous M, Berkovitz GD, McElreavey K. Absence of mutations involving the LIM homeobox domain gene LHX9 in 46,XY gonadal agenesis and dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 2465-2469.
8. Canto P, Vilchis F, Soderlund D, Reyes E, Mendez JP. A heterozygous mutation in the desert hedgehog gene in patients with mixed gonadal dysgenesis. *Mol Hum Reprod.* 2005; 11: 833-836.

9. DiNapoli L, Batchvarov J, Capel B. FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis. *Development*. 2006; 133: 1519-1527.
10. Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Shiroishi T, Nakahara Y, Hashimoto N, Noguchi K, Higashinakagawa T. Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature*. 1998; 393: 688-692.
11. Boyer A, Dornan S, Daneau I, Lussier J, Silversides DW. Conservation of the function of DMRT1 regulatory sequences in mammalian sex differentiation. *Genesis*. 2002; 34: 236-243.
12. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*. 2008; 453: 930-934.
13. Koopman P. Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cell Mol Life Sci*. 1999; 55: 839-856.
14. Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Behringer RR. Genetic studies of MIS signalling in sexual development. *Novartis Found Symp*. 2002; 244: 157-164; discussion 164-158, 203-156, 253-157.
15. Hughes IA, Deeb A. Androgen resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006; 20: 577-598.
16. Siiteri PK, Wilson JD. Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1974; 38: 113-125.
17. Ellsworth K, Harris G. Expression of the type 1 and 2 steroid 5 alpha-reductases in human fetal tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 215: 774-780.
18. Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ. Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol Cell Endocrinol*. 1992; 88: 15-22.
19. Takeda H, Mizuno T, Lasnitzki I. Autoradiographic studies of androgen-binding sites in the rat urogenital sinus and postnatal prostate. *J Endocrinol*. 1985; 104: 87-92.

20. Nef S, Parada LF. Hormones in male sexual development. *Genes Dev.* 2000; 14: 3075-3086.
21. Nef S, Parada LF. Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nat Genet.* 1999; 22: 295-299.
22. Hughes IA, Acerini CL. Factors controlling testis descent. *Eur J Endocrinol.* 2008; 159 Suppl 1: S75-82.
23. Hutson JM. Testicular feminization: a model for testicular descent in mice and men. *J Pediatr Surg.* 1986; 21: 195-198.
24. Heyns CF, Pape VC. Presence of a low capacity androgen receptor in the gubernaculum of the pig fetus. *J Urol.* 1991; 145: 161-167.
25. Claessens F, Denayer S, Van Tilborgh N, Kerkhofs S, Helsen C, Haelens A. Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signal.* 2008; 6: e008.
26. Radpour R, Falah M, Aslani A, Zhong XY, Saleki A. Identification of a critical novel mutation in the exon 1 of androgen receptor gene in 2 brothers with complete androgen insensitivity syndrome. *J Androl.* 2009; 30: 230-232.
27. Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 3777-3782.
28. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature.* 1991; 352: 77-79.
29. Lavery DN, McEwan IJ. The human androgen receptor AF1 transactivation domain: interactions with transcription factor IIF and molten-globule-like structural characteristics. *Biochem Soc Trans.* 2006; 34: 1054-1057.
30. Verrijdt G, Tanner T, Moehren U, Callewaert L, Haelens A, Claessens F. The androgen receptor DNA-binding domain determines

- androgen selectivity of transcriptional response. *Biochem Soc Trans.* 2006; 34: 1089-1094.
31. He B, Gampe RT, Jr., Kole AJ, Hnat AT, Stanley TB, An G, Stewart EL, Kalman RI, Minges JT, Wilson EM. Structural basis for androgen receptor interdomain and coactivator interactions suggests a transition in nuclear receptor activation function dominance. *Mol Cell.* 2004; 16: 425-438.
32. Moras D, Gronemeyer H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10: 384-391.
33. Werner R, Grotsch H, Hiort O. 46,XY disorders of sex development--the undermasculinised male with disorders of androgen action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010; 24: 263-277.
34. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev.* 2002; 23: 175-200.
35. Bevan CL, Hoare S, Claessens F, Heery DM, Parker MG. The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 8383-8392.
36. Haqq CM, Donahoe PK. Regulation of sexual dimorphism in mammals. *Physiol Rev.* 1998; 78: 1-33.
37. Cutress ML, Whitaker HC, Mills IG, Stewart M, Neal DE. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *J Cell Sci.* 2008; 121: 957-968.
38. Shaffer PL, Jivan A, Dollins DE, Claessens F, Gewirth DT. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 4758-4763.
39. Heemers HV, Tindall DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev.* 2007; 28: 778-808.

40. Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42: 813-827.
41. The Androgen Receptor Gene Mutations Database World Wide Web Server [database on the Internet] 2011. Available from: <http://androgendb.mcgill.ca/>.
42. Sun S, Luo F, Zhou Z, Wu W. A novel androgen receptor gene mutation in a Chinese patient with complete androgen insensitivity syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010; 153: 173-175.
43. Gottlieb B, Beitel LK, Wu JH, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum Mutat.* 2004; 23: 527-533.
44. Ferlin A, Vinanzi C, Garolla A, Selice R, Zuccarello D, Cazzadore C, Foresta C. Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006; 65: 606-610.
45. Beitel LK, Prior L, Vasiliou DM, Gottlieb B, Kaufman M, Lumbroso R, Alvarado C, McGillivray B, Trifiro M, Pinsky L. Complete androgen insensitivity due to mutations in the probable alpha-helical segments of the DNA-binding domain in the human androgen receptor. *Hum Mol Genet.* 1994; 3: 21-27.
46. Ris-Stalpers C, Turberg A, Verleun-Mooyman MC, Romalo G, Schweikert HU, Trapman J, Brinkmann AO. Expression of an aberrantly spliced androgen receptor mRNA in a family with complete androgen insensitivity. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 684: 239-242.
47. Hellwinkel OJ, Holterhus PM, Struve D, Marschke C, Homburg N, Hiort O. A unique exonic splicing mutation in the human androgen receptor gene indicates a physiologic relevance of regular androgen receptor transcript variants. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 2569-2575.

48. Hiort O, Sinnecker GH, Holterhus PM, Nitsche EM, Kruse K. Inherited and de novo androgen receptor gene mutations: investigation of single-case families. *J Pediatr.* 1998; 132: 939-943.
49. Rodien P, Mebarki F, Mowszowicz I, Chaussain JL, Young J, Morel Y, Schaison G. Different phenotypes in a family with androgen insensitivity caused by the same M780I point mutation in the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 2994-2998.
50. Jaaskelainen J, Deeb A, Schwabe JW, Mongan NP, Martin H, Hughes IA. Human androgen receptor gene ligand-binding-domain mutations leading to disrupted interaction between the N- and C-terminal domains. *J Mol Endocrinol.* 2006; 36: 361-368.
51. Hiort O, Holterhus PM, Horter T, Schulze W, Kremke B, Bals-Pratsch M, Sinnecker GH, Kruse K. Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 2810-2815.
52. Holterhus PM, Sinnecker GH, Hiort O. Phenotypic diversity and testosterone-induced normalization of mutant L712F androgen receptor function in a kindred with androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 3245-3250.
53. Baldazzi L, Baroncini C, Pirazzoli P, Balsamo A, Capelli M, Marchetti G, Bernardi F, Cacciari E. Two mutations causing complete androgen insensitivity: a frame-shift in the steroid binding domain and a Cys-->Phe substitution in the second zinc finger of the androgen receptor. *Hum Mol Genet.* 1994; 3: 1169-1170.
54. Singh R, Singh P, Gupta NJ, Chakrabarty B, Singh L, Thangaraj K. C601S mutation in the androgen receptor results in partial loss of androgen function. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 122: 359-363.
55. Holterhus PM, Werner R, Hoppe U, Bassler J, Korsch E, Ranke MB, Dorr HG, Hiort O. Molecular features and clinical phenotypes in androgen insensitivity syndrome in the absence and presence of androgen receptor gene mutations. *J Mol Med.* 2005; 83: 1005-1013.

56. Mhatre AN, Trifiro MA, Kaufman M, Kazemi-Esfarjani P, Figlewicz D, Rouleau G, Pinsky L. Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet.* 1993; 5: 184-188.
57. Werner R, Holterhus PM, Binder G, Schwarz HP, Morlot M, Struve D, Marschke C, Hiort O. The A645D mutation in the hinge region of the human androgen receptor (AR) gene modulates AR activity, depending on the context of the polymorphic glutamine and glycine repeats. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 3515-3520.
58. Wilson JM, Arnheim A, Champeau A, Ebbers M, Coakley F, Baskin L. Complete androgen insensitivity syndrome: an anatomic evaluation and sexual function questionnaire pilot study. *J Pediatr Urol.* 2011; 7: 416-421.
59. Crouch NS, Michala L, Creighton SM, Conway GS. Androgen-dependent measurements of female genitalia in women with complete androgen insensitivity syndrome. *BJOG.* 2011; 118: 84-87.
60. Tripathy K, Gouda K, Palai PK, Das L. Familial complete androgen insensitivity syndrome with prostatic tissue and seminal vesicles. *Arch Gynecol Obstet.* 2010; 282: 581-583.
61. Rajender S, Pooja S, Gupta NJ, Chakrabarty B, Singh L, Thangaraj K. G708E mutation in the androgen receptor results in complete loss of androgen function. *J Androl.* 2011; 32: 193-198.
62. Hannema SE, Scott IS, Hodapp J, Martin H, Coleman N, Schwabe JW, Hughes IA. Residual activity of mutant androgen receptors explains wolffian duct development in the complete androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 5815-5822.
63. Audi L, Fernandez-Cancio M, Carrascosa A, Andaluz P, Toran N, Piro C, Vilaro E, Vicens-Calvet E, Gussinye M, Albisu MA, Yeste D, Clemente M, Hernandez de la Calle I, Del Campo M, Vendrell T, Blanco A, Martinez-Mora J, Granada ML, Salinas I, Forn J, Calaf J, Angerri O, Martinez-Sopena MJ, Del Valle J, Garcia E, Gracia-

Bouthelier R, Lapunzina P, Mayayo E, Labarta JI, Lledo G, Sanchez Del Pozo J, Arroyo J, Perez-Aytes A, Beneyto M, Segura A, Borrás V, Gabau E, Caimari M, Rodríguez A, Martínez-Aedo MJ, Carrera M, Castano L, Andrade M, Bermudez de la Vega JA. Novel (60%) and recurrent (40%) androgen receptor gene mutations in a series of 59 patients with a 46,XY disorder of sex development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95: 1876-1888.

64. Papadimitriou DT, Linglart A, Morel Y, Chaussain JL. Puberty in subjects with complete androgen insensitivity syndrome. *Horm Res.* 2006; 65: 126-131.

65. Xiaochun Y, Jia W, Linlin Y, Xi X. Torsion of the testicle in a patient with complete androgen insensitivity syndrome. *J Obstet Gynaecol.* 2010; 30: 639-640.

66. Ozdemir I, Tarcan T, Yazici C, Simsek F. Complete testicular feminization—a case report and review of the literature. *Marmara Med J.* 2004; 17: 121-123

67. Lukas-Croisier C, Lasala C, Nicaud J, Bedecarras P, Kumar TR, Dutertre M, Matzuk MM, Picard JY, Josso N, Rey R. Follicle-stimulating hormone increases testicular anti-Müllerian hormone (AMH) production through Sertoli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH gene. *Molecular Endocrinology.* 2003; 17: 550-561.

68. Tsukada T, Inoue M, Tachibana S, Nakai Y, Takebe H. An Androgen Receptor Mutation Causing Androgen Resistance in Undervirilized Male Syndrome. *J Clin Endocr Metab.* 1994; 79: 1202-1207.

69. Yong EL, Lim J, Qi W, Ong V, Mifsud A. Molecular basis of androgen receptor diseases. *Ann Med.* 2000; 32: 15-22.

70. Galli-Tsinopoulou A, Hiort O, Schuster T, Messer G, Kuhnle U. A novel point mutation in the hormone binding domain of the androgen receptor associated with partial and minimal androgen insensitivity syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2003; 16: 149-154.

71. Appari M, Werner R, Wunsch L, Cario G, Demeter J, Hiort O, Riepe F, Brooks JD, Holterhus PM. Apolipoprotein D (APOD) is a putative biomarker of androgen receptor function in androgen insensitivity syndrome. *J Mol Med.* 2009; 87: 623-632.
72. Dubbink HJ, Hersmus R, Verma CS, van der Korput HA, Berrevoets CA, van Tol J, Ziel-van der Made AC, Brinkmann AO, Pike AC, Trapman J. Distinct recognition modes of FXXLF and LXXLL motifs by the androgen receptor. *Mol Endocrinol.* 2004; 18: 2132-2150.
73. He B, Kemppainen JA, Wilson EM. FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH₂-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *J Biol Chem.* 2000; 275: 22986-22994.
74. He B, Gampe RT, Jr., Hnat AT, Faggart JL, Minges JT, French FS, Wilson EM. Probing the functional link between androgen receptor coactivator and ligand-binding sites in prostate cancer and androgen insensitivity. *J Biol Chem.* 2006; 281: 6648-6663.
75. He B, Kemppainen JA, Voegel JJ, Gronemeyer H, Wilson EM. Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH₂-terminal domain. *J Biol Chem.* 1999; 274: 37219-37225.
76. Thompson J, Saatcioglu F, Janne OA, Palvimo JJ. Disrupted amino- and carboxyl-terminal interactions of the androgen receptor are linked to androgen insensitivity. *Mol Endocrinol.* 2001; 15: 923-935.
77. Wong HY, Hoogerbrugge JW, Pang KL, van Leeuwen M, van Royen ME, Molier M, Berrevoets CA, Dooijes D, Dubbink HJ, van de Wijngaart DJ, Wolffenbuttel KP, Trapman J, Kleijer WJ, Drop SL, Grootegoed JA, Brinkmann AO. A novel mutation F826L in the human androgen receptor in partial androgen insensitivity syndrome; increased NH₂-/COOH-terminal domain interaction and TIF2 co-activation. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 292: 69-78.

78. Nguyen D, Steinberg SV, Rouault E, Chagnon S, Gottlieb B, Pinsky L, Trifiro M, Mader S. A G577R mutation in the human AR P box results in selective decreases in DNA binding and in partial androgen insensitivity syndrome. *Mol Endocrinol.* 2001; 15: 1790-1802.
79. Bruggenwirth HT, Boehmer AL, Lobaccaro JM, Chiche L, Sultan C, Trapman J, Brinkmann AO. Substitution of Ala564 in the first zinc cluster of the deoxyribonucleic acid (DNA)-binding domain of the androgen receptor by Asp, Asn, or Leu exerts differential effects on DNA binding. *Endocrinology.* 1998; 139: 103-110.
80. Farla P, Hersmus R, Geverts B, Mari PO, Nigg AL, Dubbink HJ, Trapman J, Houtsmuller AB. The androgen receptor ligand-binding domain stabilizes DNA binding in living cells. *J Struct Biol.* 2004; 147: 50-61.
81. Forest MG, Cathiard AM, Bertrand JA. Evidence of testicular activity in early infancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1973; 37: 148-151.
82. Gendrel D, Chaussain JL, Roger M, Job JC. Simultaneous postnatal rise of plasma LH and testosterone in male infants. *J Pediatr.* 1980; 97: 600-602.
83. Pediatrik Endokrinoloji ve Oksoloji Derneği. Pubertal fizyoloji. In: Günöz H, Öçal G, Yordam N, Kurtoğlu S, eds. *Pediatrik Endokrinoloji.* Ankara: Pediatrik Endokrinoloji ve Oksoloji Derneği Yayınları, 2003: 137-153.
84. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev.* 1995; 16: 271-321.
85. Bouvattier C, Carel JC, Lecointre C, David A, Sultan C, Bertrand AM, Morel Y, Chaussain JL. Postnatal changes of T, LH, and FSH in 46,XY infants with mutations in the AR gene. *J Clin Endocr Metab.* 2002; 87: 29-32.
86. Shinkawa O, Furuhashi N, Fukaya T, Suzuki M, Kono H, Tachibana Y. Changes of serum gonadotropin levels and sex

differences in premature and mature infant during neonatal life. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983; 56: 1327-1331.

87. Goji K, Tanikaze S. Spontaneous gonadotropin and testosterone concentration profiles in prepubertal and pubertal boys: temporal relationship between luteinizing hormone and testosterone. *Pediatr Res.* 1993; 34: 229-236.

88. Hiort O, Willenbring H, Albers N, Hecker W, Engert J, Dibbelt L, Sinnecker GH. Molecular genetic analysis and human chorionic gonadotropin stimulation tests in the diagnosis of prepubertal patients with partial 5 alpha-reductase deficiency. *Eur J Pediatr.* 1996; 155: 445-451.

89. Pang S, Levine LS, Chow D, Sagiani F, Saenger P, New MI. Dihydrotestosterone and its relationship to testosterone in infancy and childhood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979; 48: 821-826.

90. Forest MG, Mollard P, David M, Morel Y, Bertrand J. [Incomplete androgen insensitivity syndrome. Difficulties of diagnosis and management]. *Arch Fr Pediatr.* 1990; 47: 107-113.

91. Cheon CK. Practical approach to steroid 5alpha-reductase type 2 deficiency. *Eur J Pediatr.* 2011; 170: 1-8.

92. Madden JD, Walsh PC, MacDonald PC, Wilson JD. Clinical and endocrinologic characterization of a patients with the syndrome of incomplete testicular feminization. *J Clin Endocrinol Metab.* 1975; 41: 751-760.

93. Boyar RM, Moore RJ, Rosner W, Aiman J, Chipman J, Madden JD, Marks JF, Griffin JE. Studies of gonadotropin-gonadal dynamics in patients with androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1978; 47: 1116-1122.

94. Melo KF, Mendonca BB, Billerbeck AE, Costa EM, Inacio M, Silva FA, Leal AM, Latronico AC, Arnhold IJ. Clinical, hormonal, behavioral, and genetic characteristics of androgen insensitivity syndrome in a Brazilian cohort: five novel mutations in the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 3241-3250.

95. Ahmed SF, Cheng A, Hughes IA. Assessment of the gonadotrophin-gonadal axis in androgen insensitivity syndrome. *Arch Dis Child.* 1999; 80: 324-329.
96. Ahmed SF, Cheng A, Dovey L, Hawkins JR, Martin H, Rowland J, Shimura N, Tait AD, Hughes IA. Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 658-665.
97. Coutant R, Mallet D, Lahlou N, Bouhours-Nouet N, Guichet A, Coupriis L, Croue A, Morel Y. Heterozygous mutation of steroidogenic factor-1 in 46,XY subjects may mimic partial androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 2868-2873.
98. Yalinkaya A, Yayla M, Erdemoglu M. Prenatal diagnosis of a fetus with androgen insensitivity syndrome (AIS). *Prenat Diagn.* 2007; 27: 856-857.
99. Bianca S, Cataliotti A, Bartoloni G, Torrente I, Barrano B, Boemi G, Lo Presti M, Indaco L, Barone C, Ettore G. Prenatal diagnosis of androgen insensitivity syndrome. *Fetal Diagn Ther.* 2009; 26: 167-169.
100. Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA. Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child.* 2006; 91: 554-563.
101. Weidemann W, Peters B, Romalo G, Spindler KD, Schweikert HU. Response to androgen treatment in a patient with partial androgen insensitivity and a mutation in the deoxyribonucleic acid-binding domain of the androgen receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 1173-1176.
102. Giwercman A, Bruun E, Frimodt-Moller C, Skakkebaek NE. Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes of men with a history of cryptorchidism. *J Urol.* 1989; 142: 998-1001: discussion 1001-1002.

103. Sun SC, Luo FW, Zhou ZM, Wu WQ. A novel androgen receptor gene mutation in a Chinese patient with complete androgen insensitivity syndrome. *Eur J Obstet Gyn R B*. 2010; 153: 173-175.
104. Robby SJ, Bentley RC, Russell P, Anderson MC. Pathology of abnormal sexual developmen. In: Fox H, Wells M, eds. *Haines and Taylor textbook of obstetrical and gynecological pathology*. Philadelphia, 2003: 1217-1219.
105. Singh R, Deepa SR, Madhavi S, Gupta NJ, Chakravarty B, Singh L, Thangaraj K. Male infertility: no evidence of involvement of androgen receptor gene among Indian men. *J Androl*. 2006; 27: 102-105.
106. Georget V, Terouanne B, Nicolas JC, Sultan C. Mechanism of antiandrogen action: key role of hsp90 in conformational change and transcriptional activity of the androgen receptor. *Biochemistry*. 2002; 41: 11824-11831.
107. Hong H, Darimont BD, Ma H, Yang L, Yamamoto KR, Stallcup MR. An additional region of coactivator GRIP1 required for interaction with the hormone-binding domains of a subset of nuclear receptors. *J Biol Chem*. 1999; 274: 3496-3502.
108. Wong CI, Zhou ZX, Sar M, Wilson EM. Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH2-terminal and steroid-binding domains. *J Biol Chem*. 1993; 268: 19004-19012.
109. Zhou XE, Suino-Powell KM, Li J, He Y, Mackeigan JP, Melcher K, Yong EL, Xu HE. Identification of SRC3/AIB1 as a preferred coactivator for hormone-activated androgen receptor. *J Biol Chem*. 2010; 285: 9161-9171.
110. Sinnecker GH, Hiort O, Nitsche EM, Holterhus PM, Kruse K. Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. German Collaborative Intersex Study Group. *Eur J Pediatr*. 1997; 156: 7-14.

111. Grumbach MM, Conte FA. Disorders of sex differentiation. In: Wilson JD, Foster DW, eds. *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia: Saunders, 1991: 853-951.
112. Pergament E, Heimler A, Shah P. Testicular feminisation and inguinal hernia. *Lancet*. 1973; 2: 740-741.
113. Brown TR. Androgen receptor dysfunction in human androgen insensitivity. *Trends Endocrinol Metab*. 1995; 6: 170-175.
114. Chavez B, Mendez JP, Ulloa-Aguirre A, Larrea F, Vilchis F. Eight novel mutations of the androgen receptor gene in patients with androgen insensitivity syndrome. *J Hum Genet*. 2001; 46: 560-565.
115. Sorting Intolerant From Tolerant. Available from: http://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_BLink_submit.html.
116. PolyPhen-2 prediction of functional effects of human nsSNPs. Available from: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.
117. Peters I, Weidemann W, Romalo G, Knorr D, Schweikert HU, Spindler KD. An androgen receptor mutation in the direct vicinity of the proposed C-terminal alpha-helix of the ligand binding domain containing the AF-2 transcriptional activating function core is associated with complete androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol*. 1999; 148: 47-53.
118. He B, Wilson EM. Electrostatic modulation in steroid receptor recruitment of LXXLL and FXXLF motifs. *Mol Cell Biol*. 2003; 23: 2135-2150.
119. Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, Fletterick RJ, Yamamoto KR. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev*. 1998; 12: 3343-3356.
120. Schaufele F, Carbonell X, Guerbodot M, Borngraeber S, Chapman MS, Ma AA, Miner JN, Diamond MI. The structural basis of androgen receptor activation: intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 9802-9807.

121. Hsu CL, Chen YL, Ting HJ, Lin WJ, Yang Z, Zhang Y, Wang L, Wu CT, Chang HC, Yeh S, Pimplikar SW, Chang C. Androgen receptor (AR) NH₂- and COOH-terminal interactions result in the differential influences on the AR-mediated transactivation and cell growth. *Mol Endocrinol.* 2005; 19: 350-361.
122. Axerio-Cilies P, Lack NA, Nayana MR, Chan KH, Yeung A, Leblanc E, Guns ES, Rennie PS, Cherkasov A. Inhibitors of Androgen Receptor Activation Function-2 (AF2) Site Identified through Virtual Screening. *J Med Chem.* 2011.
123. Langley E, Kemppainen JA, Wilson EM. Intermolecular NH₂- /carboxyl-terminal interactions in androgen receptor dimerization revealed by mutations that cause androgen insensitivity. *J Biol Chem.* 1998; 273: 92-101.
124. Sharma M, Zarnegar M, Li X, Lim B, Sun Z. Androgen receptor interacts with a novel MYST protein, HBO1. *J Biol Chem.* 2000; 275: 35200-35208.
125. Wang Q, Lu J, Yong EL. Ligand- and coactivator-mediated transactivation function (AF2) of the androgen receptor ligand-binding domain is inhibited by the cognate hinge region. *J Biol Chem.* 2001; 276: 7493-7499.
126. Deeb A, Mason C, Lee YS, Hughes IA. Correlation between genotype, phenotype and sex of rearing in 111 patients with partial androgen insensitivity syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005; 63: 56-62.
127. Wang Q, Ghadessy FJ, Yong EL. Analysis of the transactivation domain of the androgen receptor in patients with male infertility. *Clin Genet.* 1998; 54: 185-192.
128. Gottlieb B, Vasiliou DM, Lumbroso R, Beitel LK, Pinsky L, Trifiro MA. Analysis of exon 1 mutations in the androgen receptor gene. *Hum Mutat.* 1999; 14: 527-539.
129. Batch JA, Williams DM, Davies HR, Brown BD, Evans BA, Hughes IA, Patterson MN. Androgen receptor gene mutations

identified by SSCP in fourteen subjects with androgen insensitivity syndrome. *Hum Mol Genet.* 1992; 1: 497-503.

130. Hiort O, Klauber G, Cendron M, Sinnecker GH, Keim L, Schwinger E, Wolfe HJ, Yandell DW. Molecular characterization of the androgen receptor gene in boys with hypospadias. *Eur J Pediatr.* 1994; 153: 317-321.

131. Kim SH, Kim KS, Kim GH, Kang BM, Yoo HW. A novel frameshift mutation in the 5alpha-reductase type 2 gene in Korean sisters with male pseudohermaphroditism. *Fertil Steril.* 2006; 85: 750 e759-750 e712.

132. Ferraz LF, Mathias Baptista MT, Maciel-Guerra AT, Junior GG, Hackel C. New frameshift mutation in the 5alpha-reductase type 2 gene in a Brazilian patient with 5alpha-reductase deficiency. *Am J Med Genet.* 1999; 87: 221-225.

EK 1

GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KOMİSYONU DEĞERLENDİRME FORMU

DEĞERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu
AÇIK ADRES	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Morfoloji Binası 06100 Sıhhye/Ankara
TELEFON	0312 310 30 10/227
FAKS	0312 310 63 70
E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	46,XY kromozom kuruluşu cinsel gelişim bozukluğu gösteren bireylerde androjen reseptör gen değişikliklerinin araştırılması		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU			
	EUDRACT NUMARASI			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Hatice İlgin Ruhi		
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Genetik		
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI			
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Anabilim Dalı		
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ			
	BAŞVURULAN DEĞERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu		
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ <input checked="" type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>	

ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	
	FAZ 2	<input type="checkbox"/>	
	FAZ 3	<input type="checkbox"/>	
	FAZ 4	<input type="checkbox"/>	
	BE/BY	<input type="checkbox"/>	
	DİĞER	<input type="checkbox"/>	Diger ise belirtiniz:
	ILAC DIŞI ARAŞTIRMA	<input type="checkbox"/>	Belirtiniz:

ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>
-------------------------------	-------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------	---------------------------------------

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	13.08.2010	01	Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diger <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diger <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	13.08.2010	01	Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diger <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diger <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>	
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>	
	İLÂN	<input type="checkbox"/>	
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	
DİĞER	<input type="checkbox"/>		

Hasan TUNA
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genetik Anabilim Dalı Başkanı



19 Ekim 2010

ASBY GENETİK

Etik Kurul Değerlendirme Formu
28 Nisan 2009 Versiyon No:1

1

EK 1-devam

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:16-339	Tarih: 04 Ekim 2010
	Doç.Dr.Hatice Ilgın Ruhi'nin sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler; araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile bilgilendirilmiş gönüllü olur formu dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	

DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ

CALISMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu ve SOP
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Mehmet Mellî	Tıbbî Farmakoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	M. Mellî
Prof.Dr.Ahmet Demirkazık	Tıbbî Onkoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ajan Tükün	Tıbbî Genetik	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	Şehir dışında
Prof.Dr.Nuhan Puralı	Biyofizik	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.H.Serdar Öztürk	Tıbbî Biyokimya	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Bülent Gümüşel	Eczaçı-Öğr.Üyesi	Hacettepe Üni. Ecz. Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.H.Serap Sivri	Çocuk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Muharrem Özen	Avukat-Öğr.Üyesi	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	Toplantıda
Prof.Dr.Banu Çakır	Halk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Öğr.Gör.Dr.Volkan Kavas	Deontoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Gülşüm Aslan	Sağlık Mes. Dışı- Emekli		E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

Hasan TUNA
Fakültesi
Asistanel Birim Sorumlusu



10 Ekim 2010

ASLI GİRİLDİ

EK 2

46,XY Kromozom Kuruluşlu Cinsel Gelişim Bozukluğu Gösteren Bireylerde Androjen Reseptör Gen Değişikliklerinin Araştırılması	
Gönüllü adı baş harfleri :	Tarih: / /
Gönüllü numarası :	

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (Rıza/olur alma işleminin olanaklı olmadığı bireyler için)

Araştırmanın Adı: 46,XY Kromozom Kuruluşlu Cinsel Gelişim Bozukluğu Gösteren Bireylerde Androjen Reseptör Gen Değişikliklerinin Araştırılması

Araştırmanın Kolay Anlaşılır Adı: Androjen duyarlılık sendromu ile izlenen hastaların moleküler genetik analiz yöntemi ile kesin tanıların konulması

Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Hatice İLGİN RUHİ

Katılacak olduğunuz çalışma bir araştırma niteliğindedir.

Androjen reseptör proteini, cinsiyet farklılaşması ve normal erkek cinsiyet gelişiminde görev almaktadır. Androjen reseptör proteini, androjen reseptör geni tarafından kodlanmaktadır. Androjen duyarlılık sendromu, X'e bağlı kalıtılan bir hastalıktır. Bu hastalıkta androjen reseptör gen değişikliğine bağlı olarak, androjen reseptöründe tam veya kısmi fonksiyon kaybı ortaya çıkar ve 46,XY kromozom kuruluşlu bireylerde cinsiyet gelişim bozukluğuna neden olur. 5 α -redüktaz-2 enzim bozukluğu da benzer bir klinik tabloya neden olmaktadır. Bazı olgularda sadece klinik değerlendirme ve laboratuvar verileriyle bu iki hastalığın ayırıcı tanısını yapmada büyük zorluklar yaşanmaktadır. Androjen duyarlılık sendromunun kesin tanısı genetik inceleme ile konulabilmektedir. Planlanan bu çalışma, ülkemizde ilk defa yapılacak olup gönüllü popülasyonda tam veya kısmi reseptör duyarlılığına neden olan androjen reseptör gen değişikliklerinin tespit edilmesi hedeflenmektedir.

Çalışma kapsamında gönüllülere verilecek herhangi bir ilaç bulunmamaktadır. Bu çalışmaya katılan gönüllülerin tedavi ya da izlemine müdahale edilmeksizin, kan örneklerinde çalışma yapılacaktır ve incelemelerin sonuçları kaydedilecektir. Bu bilgi bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Bu çalışmaya katılan gönüllülerin sonuçları yasal temsilcileri ve ilgili hekimleriyle paylaşılacaktır. Planlanan çalışmanın 1 yıllık süre içerisinde tamamlanması hedeflenmektedir.

Çalışmaya tam veya kısmi androjen duyarlılık sendromu ön tanılı 50 birey alınacaktır. Bu çalışmaya, çocuğunuz/yasal temsilcisi olduğunuz birey androjen duyarlılık sendromu ön tanısı aldığı için davet edilmiştir. Çalışmaya katılma zorunluluğu bulunmamaktadır. Araştırmada, hormonal analiz amacıyla çocuğunuzun/yasal temsilcisi olduğunuz bireyin kolundan alınmış kanın artan miktarı kullanılacaktır veya bir kez 15 damla (0,5 ml) kan alınacaktır. Bu kandan DNA elde edildikten sonra, androjen reseptör geninin protein kodlayan dizileri ve bu dizilerin birleşme bölgeleri çoğaltılacaktır. Elde edilen ürünlerde direkt dizileme olarak isimlendirilen bir genetik test yöntemi uygulanarak, androjen reseptör gen değişiklikleri araştırılacaktır. Düşük bir olasılıkla çocuğunuzdaki/yasal temsilcisi olduğunuz bireydeki klinik tabloyu açıklayacak herhangi bir androjen reseptör gen değişikliği bulunamayabilir. Katılacağınız bu araştırma ile söz konusu hastalığın tanısı kesinlik kazanarak bundan sonraki izlemler buna göre planlanabilecektir.

Kan alma işlemi sterilite kurallarına uyularak yapıldığı takdirde enfeksiyon bulaşma riski bulunmamaktadır. Kan alma işleminin ciddi bir riski yoktur; sadece işlem sırasında çok hafif bir ağrı ve sonrasında bir miktar morarma olabilmekte, ancak 2 dakika süre ile kan alınan noktaya pamuk ile bastırıldığında morarma olasılığı çok azalmaktadır.

Çalışma grubuna alınacak gönüllülerde, androjen reseptör gen değişikliğine yönelik yapılacak testler **ÜCRETSİZ OLUP ŞİZDEN VEYA BAĞLI BULUNDUĞUNUZ SİGORTA KURUMUNDAN HİÇBİR ÜCRET TALEP EDİLMEYECEKTİR.**

Bilgilendirilmiş olur verdiğiniz takdirde, çocuğunuz/yasal temsilcisi olduğunuz birey çalışmaya dahil edilecektir. Çalışma süresince, herhangi bir zamanda hiçbir mazeret bildirmeden olurunuzu geri alma hakkına sahipsiniz ve bundan dolayı çocuğunuzun/yasal temsilcisi olduğunuz bireyin sonraki tıbbi takip ve tedavileri esnasında mevcut haklarından herhangi bir kayba uğraması söz konusu değildir. Araştırma konusuyla ilgili, araştırmaya katılmaya devam etme isteğinin etkilenebileceği yeni bilgiler söz konusu olduğunda, size derhal bilgi verilecektir.

Kaydedeceğimiz çocuğunuza/yasal temsilcisi olduğunuz bireye ait veriler (muayene bulguları, patolojik bulgu fotoğrafları, hormon analiz sonuçları, androjen reseptör (Androgen receptor-AR) gen

EK 2-devam

46,XY Kromozom Kuruluşlu Cinsel Gelişim Bozukluğu Gösteren Bireylerde Androjen Reseptör Gen Değişikliklerinin Araştırılması	
Gönüllü adı baş harfleri :	Tarih: / /
Gönüllü numarası :	

değişiklikleri) gizlilik kurallarına uygun olarak saklanacak ve sonuçlar bilimsel amaçla yayımlandığında, çocuğunuzun/yasal temsilcisi olduğunuz bireyin kimlik bilgileri gizli tutulacaktır. Bu araştırmaya çocuğunuzun/yasal temsilcisi olduğunuz bireyin katılımını kabul ederseniz, çocuğunuzun/yasal temsilcisi olduğunuz bireyin ismi ve tıbbi kayıtları gizli tutulacak ve hastane dışında açıklanmayacaktır. Bu belgeyi imzalayarak çocuğunuzun/yasal temsilcisi olduğunuz bireyin tıbbi bilgilerinin bu şartlar altında kullanılmasına izin vermektedir.

Eğer çalışma ile ilgili daha detaylı bilgi almak isterseniz veya çalışma süresince aklınıza takılan bir soru olursa, çalışmanın sorumlu yürütücüsü/yardımcı araştırmacısı olan **Doç. Dr. Hatice ILGIN RUHI/ Dr. Vehap TOPÇU'** ya danışabilirsiniz.

Tel: (0 312) 310 30 10/363-327

GSM: 0 505 234 76 90

Gönüllü Oluru

Bu sayfayı imzalamakla gönüllü olarak çocuğumun/yasal temsilcisi olduğum bireyin bu çalışmaya katılımını kabul etmiş olacağım konusunda bilgilendirildim. Yukarıdaki bilgileri okudum. Aynı zamanda bana sözlü açıklama da yapıldı. Bu koşullar altında, kendi rızam ile çocuğumun/yasal temsilcisi olduğum bireyin bu çalışmaya katılımını kabul ediyorum. Çocuğuma/yasal temsilcisi olduğum bireye ait tıbbi kayıtların sağlık otoritelerince incelenebileceğini anladım ve bu kişilere izin veriyorum.

Alınan kan örneğinin aşağıdaki koşullarda kullanılmasına izin veriyorum. (Aşağıdaki şıklardan yalnız birini seçiniz)

- Çocuğumdan/yasal temsilcisi olduğum bireyden alınan kan örneğinin yalnızca bu çalışma için kullanılmasını onaylıyorum. İleride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.
- Çocuğumdan/yasal temsilcisi olduğum bireyden alınan kan örneğinin yalnızca bu çalışma için kullanılmasını onaylıyorum. İleride yapılması olası diğer çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- Çocuğumdan/yasal temsilcisi olduğum bireyden alınan kan örneğinin araştırma konusu ile bağlantılı diğer çalışmalarda kullanılmasını onaylıyorum. Ancak, farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- Çocuğumdan/yasal temsilcisi olduğum bireyden alınan kan örneğinin önerilen çalışma için kullanılmasını onaylıyorum. Gelecekte yapılması olası her türlü çalışmada da isimleştirilerek kullanılmasını onaylıyorum.

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

Bu formun imzalı bir kopyası yasal temsilciye verilecek, bir kopyası araştırmacıda kalacaktır.

EK 2-devam

46,XY Kromozom Kuruluşlu Cinsel Gelişim Bozukluğu Gösteren Bireylerde Androjen Reseptör Gen Değişikliklerinin Araştırılması	
Gönüllü adı baş harfleri :	Tarih: / /
Gönüllü numarası :	

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

(Rıza/olur alma işleminin olanaklı olduğu pediatrik yaş grubu için)

Araştırmanın Adı: 46,XY Kromozom Kuruluşlu Cinsel Gelişim Bozukluğu Gösteren Bireylerde Androjen Reseptör Gen Değişikliklerinin Araştırılması

Araştırmanın Kolay Anlaşılır Adı: Androjen duyarlılık sendromu ile izlenen hastaların moleküler genetik analiz yöntemi ile kesin tanıların konulması

Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Hatice İLGİN RUHİ

Katılacak olduğunuz çalışma bir araştırma niteliğindedir.

Androjen reseptör proteini, cinsiyet farklılaşması ve normal erkek cinsiyet gelişiminde görev almaktadır. Androjen reseptör proteini, androjen reseptör geni tarafından kodlanmaktadır. Androjen duyarlılık sendromu, X'e bağlı kalıtılan bir hastalıktır. Bu hastalıkta androjen reseptör gen değişikliğine bağlı olarak, androjen reseptöründe tam veya kısmi fonksiyon kaybı ortaya çıkar ve 46,XY kromozom kuruluşlu bireylerde cinsiyet gelişim bozukluğuna neden olur. 5 α -redüktaz-2 enzim bozukluğu da benzer bir klinik tabloya neden olmaktadır. Bazı olgularda sadece klinik değerlendirme ve laboratuvar verileriyle bu iki hastalığın ayırıcı tanısını yapmada büyük zorluklar yaşanmaktadır. Androjen duyarlılık sendromunun kesin tanısı genetik inceleme ile konulabilmektedir. Planlanan bu çalışma, ülkemizde ilk defa yapılacak olup gönüllü popülasyonda tam veya kısmi reseptör duyarlılığına neden olan androjen reseptör gen değişikliklerinin tespit edilmesi hedeflenmektedir.

Çalışma kapsamında gönüllülere verilecek herhangi bir ilaç bulunmamaktadır. Bu çalışmaya katılan gönüllülerin tedavi ya da izlemine müdahale edilmeksizin, kan örneklerinde çalışma yapılacaktır ve incelemelerin sonuçları kaydedilecektir. Bu bilgi bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Bu çalışmaya katılan gönüllülerin sonuçları kendileri, yasal temsilcileri ve ilgili hekimleriyle paylaşılacaktır. Planlanan çalışmanın 1 yıllık süre içerisinde tamamlanması hedeflenmektedir.

Çalışmaya tam veya kısmi androjen duyarlılık sendromu ön tanılı 50 birey alınacaktır. Bu çalışmaya, androjen duyarlılık sendromu ön tanısı konulan kişilerden olduğunuz için davet edildiniz. Çalışmaya katılma zorunluluğu bulunmamaktadır. Araştırmada, hormonal analiz amacıyla kolunuzdan alınmış kanın artan miktarı kullanılacaktır veya bir kez 15 damla (0,5 ml) kan alınacaktır. Bu kandan DNA elde edildikten sonra, androjen reseptör geninin protein kodlayan dizileri ve bu dizilerin birleşme bölgeleri çoğaltılacaktır. Elde edilen ürünlerde direkt dizileme olarak isimlendirilen bir genetik test yöntemi uygulanarak, androjen reseptör gen değişiklikleri araştırılacaktır. Düşük bir olasılıkla sizdeki klinik tabloyu açıklayacak herhangi bir androjen reseptör gen değişikliği bulunamayabilir. Katılacağınız bu araştırma ile söz konusu hastalığın tanısı kesinlik kazanarak bundan sonraki izlemler buna göre planlanabilecektir.

Kan alma işlemi sterilite kurallarına uyularak yapıldığı takdirde enfeksiyon bulaşma riski bulunmamaktadır. Kan alma işleminin ciddi bir riski yoktur; sadece işlem sırasında çok hafif bir ağrı ve sonrasında bir miktar morarma olabilmekte, ancak 2 dakika süre ile kan alınan noktaya pamuk ile bastırıldığında morarma olasılığı çok azalmaktadır.

Çalışma grubuna alınacak gönüllülerde, androjen reseptör gen değişikliğine yönelik yapılacak testler **ÜCRETSİZ OLUP SİZDEN VEYA BAĞLI BULUNDUĞUNUZ SİGORTA KURUMUNDAN HİÇBİR ÜCRET TALEP EDİLMYECEKTİR.**

Çalışmaya, siz ve yasal temsilciniz bilgilendirilmiş olur verdiğiniz takdirde dahil edileceksiniz. Çalışmaya katıldığınız takdirde, herhangi bir zamanda hiçbir mazeret bildirmeden olurunuzu geri alma hakkına sahipsiniz ve bundan dolayı sonraki tıbbi takip ve tedavi esnasında mevcut haklarınızdan herhangi bir kayba uğramanız söz konusu değildir. Araştırma konusyla ilgili, araştırmaya katılmaya devam etme isteğinin etkilenebileceği yeni bilgiler söz konusu olduğunda, gönüllü ve yasal temsilcisi zamanında bilgilendirilecektir.

EK 2-devam

46,XY Kromozom Kuruluşlu Cinsel Gelişim Bozukluğu Gösteren Bireylerde Androjen Reseptör Gen Değişikliklerinin Araştırılması	
Gönüllü adı baş harfleri :	Tarih: / /
Gönüllü numarası :	

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

(Rıza/olur alma işleminin olanaklı olduğu pediatrik yaş grubu için)

Araştırmanın Adı: 46,XY Kromozom Kuruluşlu Cinsel Gelişim Bozukluğu Gösteren Bireylerde Androjen Reseptör Gen Değişikliklerinin Araştırılması

Araştırmanın Kolay Anlaşılır Adı: Androjen duyarlılık sendromu ile izlenen hastaların moleküler genetik analiz yöntemi ile kesin tanıların konulması

Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Hatice İLGİN RUHİ

Katılacak olduğunuz çalışma bir araştırma niteliğindedir.

Androjen reseptör proteini, cinsiyet farklılaşması ve normal erkek cinsiyet gelişiminde görev almaktadır. Androjen reseptör proteini, androjen reseptör geni tarafından kodlanmaktadır. Androjen duyarlılık sendromu, X'e bağlı kalıtılan bir hastalıktır. Bu hastalıkta androjen reseptör gen değişikliğine bağlı olarak, androjen reseptöründe tam veya kısmi fonksiyon kaybı ortaya çıkar ve 46,XY kromozom kuruluşlu bireylerde cinsiyet gelişim bozukluğuna neden olur. 5 α -redüktaz-2 enzim bozukluğu da benzer bir klinik tabloya neden olmaktadır. Bazı olgularda sadece klinik değerlendirme ve laboratuvar verileriyle bu iki hastalığın ayırıcı tanısını yapmada büyük zorluklar yaşanmaktadır. Androjen duyarlılık sendromunun kesin tanısı genetik inceleme ile konulabilmektedir. Planlanan bu çalışma, ülkemizde ilk defa yapılacak olup gönüllü popülasyonda tam veya kısmi reseptör duyarlılığına neden olan androjen reseptör gen değişikliklerinin tespit edilmesi hedeflenmektedir.

Çalışma kapsamında gönüllülere verilecek herhangi bir ilaç bulunmamaktadır. Bu çalışmaya katılan gönüllülerin tedavi ya da izlemine müdahale edilmeksizin, kan örneklerinde çalışma yapılacaktır ve incelemelerin sonuçları kaydedilecektir. Bu bilgi bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Bu çalışmaya katılan gönüllülerin sonuçları kendileri, yasal temsilcileri ve ilgili hekimleriyle paylaşılacaktır. Planlanan çalışmanın 1 yıllık süre içerisinde tamamlanması hedeflenmektedir.

Çalışmaya tam veya kısmi androjen duyarlılık sendromu ön tanılı 50 birey alınacaktır. Bu çalışmaya, androjen duyarlılık sendromu ön tanısı konulan kişilerden olduğunuz için davet edildiniz. Çalışmaya katılma zorunluluğu bulunmamaktadır. Araştırmada, hormonal analiz amacıyla kolunuzdan alınmış kanın artan miktarı kullanılacaktır veya bir kez 15 damla (0,5 ml) kan alınacaktır. Bu kandan DNA elde edildikten sonra, androjen reseptör geninin protein kodlayan dizileri ve bu dizilerin birleşme bölgeleri çoğaltılacaktır. Elde edilen ürünlerde direkt dizileme olarak isimlendirilen bir genetik test yöntemi uygulanarak, androjen reseptör gen değişiklikleri araştırılacaktır. Düşük bir olasılıkla sizdeki klinik tabloyu açıklayacak herhangi bir androjen reseptör gen değişikliği bulunamayabilir. Katılacağınız bu araştırma ile söz konusu hastalığın tanısı kesinlik kazanarak bundan sonraki izlemler buna göre planlanabilecektir.

Kan alma işlemi sterilite kurallarına uyularak yapıldığı takdirde enfeksiyon bulaşma riski bulunmamaktadır. Kan alma işleminin ciddi bir riski yoktur; sadece işlem sırasında çok hafif bir ağrı ve sonrasında bir miktar morarma olabilmekte, ancak 2 dakika süre ile kan alınan noktaya pamuk ile bastırıldığında morarma olasılığı çok azalmaktadır.

Çalışma grubuna alınacak gönüllülerde, androjen reseptör gen değişikliğine yönelik yapılacak testler **ÜCRETSİZ OLUP SİZDEN VEYA BAĞLI BULUNDUĞUNUZ SİGORTA KURUMUNDAN HİÇBİR ÜCRET TALEP EDİLMYECEKTİR.**

Çalışmaya, siz ve yasal temsilciniz bilgilendirilmiş olur verdiğiniz takdirde dahil edileceksiniz. Çalışmaya katıldığınız takdirde, herhangi bir zamanda hiçbir mazeret bildirmeden olurunuzu geri alma hakkına sahipsiniz ve bundan dolayı sonraki tıbbi takip ve tedavi esnasında mevcut haklarınızdan herhangi bir kayba uğramanız söz konusu değildir. Araştırma konusyla ilgili, araştırmaya katılmaya devam etme isteğinin etkilenebileceği yeni bilgiler söz konusu olduğunda, gönüllü ve yasal temsilcisi zamanında bilgilendirilecektir.

EK 2-devam

46.XY Kromozom Kuruluşlu Cinsel Gelişim Bozukluğu Gösteren Bireylerde Androjen Reseptör Gen Değişikliklerinin Araştırılması	
Gönüllü adı baş harfleri :	Tarih: / /
Gönüllü numarası :	

Kaydedeceğimiz size ait veriler (muayene bulguları, patolojik bulgu fotoğrafları, hormon analiz sonuçları, androjen reseptör (Androgen receptor-AR) gen değişiklikleri) gizlilik kurallarına uygun olarak saklanacak ve sonuçlar bilimsel amaçla yayınlandığında, kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Bu araştırmaya katılmayı kabul ederseniz, isminiz ve tıbbi kayıtlarınız gizli tutulacak ve hastane dışında açıklanmayacaktır. Bu belgeyi imzalayarak tıbbi bilgilerinizin bu şartlar altında kullanılmasına izin vermektedir.

Eğer çalışma ile ilgili daha detaylı bilgi almak isterseniz veya çalışma süresince aklınıza takılan bir soru olursa, çalışmanın sorumlu yürütücüsü/yardımcı araştırmacısı olan **Doç. Dr. Hatice ILGIN RUHİ/ Dr. Vehap TOPÇU'** ya danışabilirsiniz.

Tel: (0 312) 310 30 10/363-327

GSM: 0 505 234 76 90

Gönüllü Oluru

Bu sayfayı imzalamakla gönüllü olarak bu çalışmaya katılmayı kabul etmiş olacağım konusunda bilgilendirildim. Yukarıdaki bilgileri okudum. Aynı zamanda bana sözlü açıklama da yapıldı. Bu koşullar altında, kendi rızam ile bu çalışmaya katılmayı kabul ediyorum. Bana ait tıbbi kayıtların sağlık otoritelerince incelenebileceğini anladım ve bu kişilere izin veriyorum.

Alınan kan örneğinin aşağıdaki koşullarda kullanılmasına izin veriyorum. (Aşağıdaki şıklardan yalnız birini seçiniz)

- Tarafımdan alınan kan örneğinin yalnızca bu çalışma için kullanılmasını onaylıyorum. İleride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.
- Tarafımdan alınan kan örneğinin yalnızca bu çalışma için kullanılmasını onaylıyorum. İleride yapılması olası diğer çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- Tarafımdan alınan kan örneğinin araştırma konusu ile bağlantılı diğer çalışmalarda kullanılmasını onaylıyorum. Ancak, farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- Tarafımdan alınan kan örneğinin önerilen çalışma için kullanılmasını onaylıyorum. Gelecekte yapılması olası her türlü çalışmada da isimsizleştirilerek kullanılmasını onaylıyorum.

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

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

EK 2-devam

46,XY Kromozom Kuruluşlu Cinsel Gelişim Bozukluğu Gösteren Bireylerde Androjen Reseptör Gen Değişikliklerinin Araştırılması	
Gönüllü adı baş harfleri :	Tarih: / /
Gönüllü numarası :	

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (Erişkin bireyler için)

Araştırmanın Adı: 46,XY Kromozom Kuruluşlu Cinsel Gelişim Bozukluğu Gösteren Bireylerde Androjen Reseptör Gen Değişikliklerinin Araştırılması

Araştırmanın Kolay Anlaşılır Adı: Androjen duyarlılık sendromu ile izlenen hastaların moleküler genetik analiz yöntemi ile kesin tanıların konulması

Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Hatice ILGIN RUHI

Katılacak olduğunuz çalışma bir araştırma niteliğindedir.

Androjen reseptör proteini, cinsiyet farklılaşması ve normal erkek cinsiyet gelişiminde görev almaktadır. Androjen reseptör proteini, androjen reseptör geni tarafından kodlanmaktadır. Androjen duyarlılık sendromu, X'e bağlı kalıtılan bir hastalıktır. Bu hastalıkta androjen reseptör gen değişikliğine bağlı olarak, androjen reseptöründe tam veya kısmi fonksiyon kaybı ortaya çıkar ve 46,XY kromozom kuruluşlu bireylerde cinsiyet gelişim bozukluğuna neden olur. 5 α -redüktaz-2 enzim bozukluğu da benzer bir klinik tabloya neden olmaktadır. Bazı olgularda sadece klinik değerlendirme ve laboratuvar verileriyle bu iki hastalığın ayırıcı tanısını yapmada büyük zorluklar yaşanmaktadır. Androjen duyarlılık sendromunun kesin tanısı genetik inceleme ile konulabilmektedir. Planlanan bu çalışma, ülkemizde ilk defa yapılacak olup gönüllü popülasyonda tam veya kısmi reseptör duyarlılığına neden olan androjen reseptör gen değişikliklerinin tespit edilmesi hedeflenmektedir.

Çalışma kapsamında gönüllülere verilecek herhangi bir ilaç bulunmamaktadır. Bu çalışmaya katılan gönüllülerin tedavi ya da izlemine müdahale edilmeksizin, kan örneklerinde çalışma yapılacaktır ve incelemelerin sonuçları kaydedilecektir. Bu bilgi bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Bu çalışmaya katılan gönüllülerin sonuçları kendileri ve ilgili hekimleriyle paylaşılacaktır. Planlanan çalışmanın 1 yıllık süre içerisinde tamamlanması hedeflenmektedir.

Çalışmaya tam veya kısmi androjen duyarlılık sendromu ön tanılı 50 birey alınacaktır. Bu çalışmaya, androjen duyarlılık sendromu ön tanısı konulan kişilerden olduğunuz için davet edildiniz. Çalışmaya katılma zorunluluğu bulunmamaktadır. Araştırmada, hormonal analiz amacıyla kolunuzdan alınmış kanın artan miktarı kullanılacaktır veya bir kez 15 damla (0,5 ml) kan alınacaktır. Bu kandan DNA elde edildikten sonra, androjen reseptör geninin protein kodlayan dizileri ve bu dizilerin birleşme bölgeleri çoğaltılacaktır. Elde edilen ürünlerde direkt dizileme olarak isimlendirilen bir genetik test yöntemi uygulanarak, androjen reseptör gen değişiklikleri araştırılacaktır. Düşük bir olasılıkla sizdeki klinik tabloyu açıklayacak herhangi bir androjen reseptör gen değişikliği bulunamayabilir. Katılacağınız bu araştırma ile söz konusu hastalığın tanısı kesinlik kazanarak bundan sonraki izlemler buna göre planlanabilecektir.

Kan alma işlemi sterilite kurallarına uyularak yapıldığı takdirde enfeksiyon bulaşma riski bulunmamaktadır. Kan alma işleminin ciddi bir riski yoktur; sadece işlem sırasında çok hafif bir ağrı ve sonrasında bir miktar morarma olabilmekte, ancak 2 dakika süre ile kan alınan noktaya pamuk ile bastırıldığında morarma olasılığı çok azalmaktadır.

Çalışma grubuna alınacak gönüllülerde, androjen reseptör gen değişikliğine yönelik yapılacak testler **ÜCRETSİZ OLUP SİZDEN VEYA BAĞLI BULUNDUĞUNUZ SİGORTA KURUMUNDAN HİÇBİR ÜCRET TALEP EDİLMEMEYECİKTİR.**

Çalışmaya, bilgilendirilmiş olur verdiğiniz takdirde dahil edileceksiniz. Çalışmaya katıldığınız takdirde, herhangi bir zamanda hiçbir mazeret bildirmeden olurunuzu geri alma hakkına sahipsiniz ve bundan dolayı sonraki tıbbi takip ve tedavi esnasında mevcut haklarınızdan herhangi bir kayba uğramanız söz konusu değildir. Araştırma konusuyla ilgili, araştırmaya katılmaya devam etme isteğinin etkilenebileceği yeni bilgiler söz konusu olduğunda, gönüllü zamanında bilgilendirilecektir.

Kaydedeceğimiz size ait veriler (muayene bulguları, patolojik bulgu fotoğrafları, hormon analiz sonuçları, androjen reseptör (Androgen receptor-AR) gen değişiklikleri) gizlilik kurallarına uygun

EK 2-devam

46.XY Kromozom Kuruluşlu Cinsel Gelişim Bozukluğu Gösteren Bireylerde Androjen Reseptör Gen Değişikliklerinin Araştırılması	
Gönüllü adı baş harfleri :	Tarih: / /
Gönüllü numarası :	

olarak saklanacak ve sonuçlar bilimsel amaçla yayınlandığında, kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Bu araştırmaya katılmayı kabul ederseniz, isminiz ve tıbbi kayıtlarınız gizli tutulacak ve hastane dışında açıklanmayacaktır. Bu belgeyi imzalayarak, tıbbi bilgilerinizin bu şartlar altında kullanılmasına izin vermektedir.

Eğer çalışma ile ilgili daha detaylı bilgi almak isterseniz veya çalışma süresince aklınıza takılan bir soru olursa, çalışmanın sorumlu yürütücüsü/yardımcı araştırmacı olan **Doç. Dr. Hatice ILGIN RUHİ/ Dr. Vehap TOPÇU'** ya danışabilirsiniz.

Tel: (0 312) 310 30 10/363-327

GSM: 0 505 234 76 90

Gönüllü Oluru

Bu sayfayı imzalamakla gönüllü olarak bu çalışmaya katılmayı kabul etmiş olacağım konusunda bilgilendirildim. Yukarıdaki bilgileri okudum. Aynı zamanda bana sözlü açıklama da yapıldı. Bu koşullar altında, kendi rızam ile bu çalışmaya katılmayı kabul ediyorum. Bana ait tıbbi kayıtların sağlık otoritelerince incelenebileceğini anladım ve bu kişilere izin veriyorum.

Alınan kan örneğimin aşağıdaki koşullarda kullanılmasına izin veriyorum. (Aşağıdaki şıklardan yalnız birini seçiniz)

- Tarafımdan alınan kan örneğinin yalnızca bu çalışma için kullanılmasını onaylıyorum. İleride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.
- Tarafımdan alınan kan örneğinin yalnızca bu çalışma için kullanılmasını onaylıyorum. İleride yapılması olası diğer çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- Tarafımdan alınan kan örneğinin araştırma konusu ile bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum. Ancak, farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- Tarafımdan alınan kan örneğinin önerilen çalışma için kullanılmasını onaylıyorum. Gelecekte yapılması olası her türlü çalışmada da isimsizleştirilerek kullanılmasını onaylıyorum.

Gönüllünün adı soyadı:	Tarih: / /
Adres :	İmza:
Tel :	
Açıklamaları yapan kişinin adı soyadı:	Tarih: / /
	İmza:

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