

5 Alfa Redüktaz Tip 2 Enzim Eksikliği Olan Hastalarda *SRD5A2* Geni Metilasyon Değişikliklerinin Araştırılması

Investigation of Methylation Alterations on *SRD5A2* Gene in Patients with 5 Alpha Reductase Type 2 Enzyme Deficiency

^{id}Emre KIRAT^a, ^{id}Aysel KALAYCI YIĞIN^a, ^{id}Filiz ÖZDEMİR^a, ^{id}Mehmet SEVEN^a

^aİstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD, İstanbul, TÜRKİYE

Bu çalışma, 3. Çocuk Genetik Sempozyumu (11-13 Ekim 2017, Antalya)'nda sözel olarak sunulmuştur.

ÖZET Amaç: 5 alfa redüktaz Tip 2 enzim eksikliği; erkek genotipli (46,XY) bireylerde cinsel gelişim bozukluğuna neden olan, otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır. 5 alfa redüktaz Tip 2 enzim eksikliği düşünülen hastalarda en önemli tanı yöntemi genital cilt fibroblast kültürü enzim analizidir. Ancak, pratikte kesin tanı *SRD5A2* (Steroid 5 alfa redüktaz alfa polipeptid 2) geni mutasyon analizi ile konulmaktadır. Klinik bulgular 5 alfa redüktaz Tip 2 enzim eksikliğini düşündürmesine rağmen, hastaların bir kısmında dizi analizi ile mutasyon tespit edilememektedir. Bu çalışmada, 5 alfa redüktaz Tip 2 enzim eksikliği ön tanısıyla izlenen ve *SRD5A2* geninde dizi analizi ile mutasyon tespit edilmeyen hastalarda metilasyon değişikliklerinin incelenmesi ve mevcut hastalıkla metilasyon değişiklikleri arasında bir ilişki olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı. **Gereç ve Yöntemler:** 5AR2E ön tanısı alan, 46,XY genotipine sahip, dış genital anomalisi olan, beta insan koryonik gonadotropini uyarısına normal testosteron yanıtı veren, testosteron/dihidrotestosteron oranı 8'in üzerinde tespit edilen ve *SRD5A2* geninde mutasyon saptanmayan hastalar ile değişik nedenlerle polikliniğimize başvuran 12 sağlıklı ve gönüllü birey kontrol grubu olarak çalışmaya dâhil edildi. **Bulgular:** Hasta grubunun *SRD5A2* genindeki 6 adet CpG adacığının metilasyon oranları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulundu ve DNA metilasyonunun *SRD5A* geninin düzenlenmesinde rol oynayabileceği gösterildi. **Sonuç:** Değişik nedenlerle genital cilt fibroblast kültüründe enzim analizi yapılamayan ve DNA dizi analizinde mutasyon bulunmayan bu hastalarda, metilasyon değişikliklerinin de değerlendirilmesinin hastalığın genetik etiolojisinin aydınlatılmasında yararlı olacağı düşünülmektedir.

ABSTRACT Objective: 5 alpha reductase Type 2 enzyme deficiency is an autosomal recessive inherited disease that causes sexual development disorder in individuals with male genotype (46,XY). Genital skin fibroblast culture enzyme analysis is the most important diagnostic method in patients with 5 alpha reductase Type 2 enzyme deficiency. However, definitive diagnosis is made by *SRD5A2* (Steroid 5 alpha reductase alpha polypeptide 2) gene mutation analysis. Although clinical findings suggest 5 alpha reductase Type 2 enzyme deficiencies, mutation cannot be detected by sequence analysis in some patients. The aim of this study was to investigate the methylation changes in patients with a pre-diagnosis of 5 alpha reductase Type 2 enzyme deficiency and who were not found mutations by sequence analysis in *SRD5A2* gene and to determine whether there was a relationship between methylation changes and current disease. **Material and Methods:** Patients with a pre-diagnosis of 5AR2E, 46,XY genotype, external genital anomaly, normal testosterone response to beta human chorionic gonadotropin stimulation, testosterone/dihydrotestosterone ratio higher than 8 and no mutation in *SRD5A2* gene and 12 healthy and volunteer individuals who applied to our outpatient clinic for various reasons as the control group were included in the study. **Results:** Methylation rates of 6 CpG islands in *SRD5A2* gene were higher in the patient group than the control group. So this showed that the DNA methylation can play a role in the regulation of the *SRD5A* gene. **Conclusion:** It is considered that the evaluation of methylation changes in these patients who cannot be analyzed in genital skin fibroblast culture due to various reasons and without mutations in DNA sequence analysis will be useful in elucidating the genetic etiology of the disease.

Anahtar Kelimeler: Cinsel gelişim bozukluğu; *SRD5A2* geni; epigenetik

Keywords: Disorders of sexual development; *SRD5A2* gene; epigenetics

Cinsel gelişim bozuklukları (CGB); genetik, hormonal ve çevresel faktörlerin rol oynadığı, kromozomal yapı ile gonad ve dış genital organların birbirleriyle uyumsuzluk gösterdiği heterojen bir

hastalık grubudur.¹ Klinik bulgular bireyler arasında ciddi farklılık göstermesine rağmen, hastalar genellikle yenidoğan döneminde ambigu genitalya ile tanınırlar.²

Correspondence: Mehmet SEVEN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD, İstanbul, TÜRKİYE/TURKEY

E-mail: mimseven@istanbul.edu.tr



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.

Received: 22 Oct 2019

Received in revised form: 11 Dec 2019

Accepted: 16 Dec 2019

Available online: 26 Dec 2019

2146-9040 / Copyright © 2020 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

CGB grubunda yer alan 46,XY 5 alfa redüktaz Tip 2 enzim eksikliği (5AR2E), erkek genotipli hastaların dış genital organlarında değişik derecelerde virilizasyon kaybına neden olabilir. Fenotip hastalar arasında çok değişken olup; spermatogenez defekti, izole hipospadias, mikropenis, kriptorşidi, ambigu genitalya, dişi fenotip, klitoris hipertrofisi ve normal dişi fenotipe kadar farklılık gösterebilmektedir.³ İnternal genital organların (epididim vas deferens, seminal vezikül ve duktus ejakulatorius) gelişimi normaldir. Testis gelişimi, testosteron ve antiMüllerian hormon üretimi normal olduğundan, Müllerian duktustan gelişen dişi iç genital organları bulunmaz. Serum testosteron seviyelerinin normal erkek seviyesinde ve serum testosteron dihidrotestosteron (DHT) oranının 8'in üzerinde olması tanıyı destekler, ancak bu oranın düşük olması hastalığı dışlamaz.⁴

5AR2E düşünülen hastaların tanısı için 2 analiz yöntemi ön plana çıkmaktadır. Bunlardan biri genital cilt fibroblast kültürü enzim analizi, diğeri ise steroid 5 alfa redüktaz alfa polipeptid 2 (*SRD5A2*) geni dizi analizidir. Fibroblast kültürü enzim analizi; pahalı olması, uzun zaman alması ve aynı zamanda etik problemler oluşturması nedeni ile pratikte uygulanmamaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan tanı yöntemi *SRD5A2* geninin dizilenmesidir.⁵

Genetik hastalıkların nedeni sadece DNA dizisinde meydana gelen değişimler olmayıp, epigenetik mekanizmaların da gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Epigenetik mekanizmalardan en iyi bilineni DNA metilasyonudur. DNA metilasyonunun etki mekanizmalarından biri, genlerin promotor bölgesindeki sitozin bazının 5. karbon atomuna metil grubu bağlanmasıyla transkripsiyonu baskılayıp geni susturmasıdır.⁶ Tümoral dokularda yapılan çalışmalarda, *SRD5A2*'nin promotor bölgesindeki metilasyon farklılığının gen ekspresyonunu, dolayısıyla gen fonksiyonunu düzenlediği gösterilmiştir.^{7,8}

Bu çalışmada, günümüze kadar daha çok malignite çalışmalarıyla gündeme gelen metilasyon değişikliklerinin, klinik ve laboratuvar bulgularıyla 5AR2E olduğu düşünülen ve *SRD5A2* geninde mutasyon saptanmayan hastalarda metilasyon değişikliklerinin incelenmesi ve mevcut hastalıkla metilasyon değişiklikleri arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada, 2011-2015 yılları arasında değişik kliniklerde 5AR2E ön tanısıyla izlenen 80 hastanın dosyası retrospektif olarak incelendi. Hasta grubuna, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı Genetik Polikliniği ile Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı Endokrinoloji Bilim Dalı polikliniğinde takip edilen 8, Göztepe Eğitim Araştırma Hastanesi Çocuk Endokrinoloji Polikliniğinde takip edilen 3 ve Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı Çocuk Endokrinoloji Bilim Dalı polikliniğinde takip edilen 1 hasta olmak üzere toplam 12 hasta dâhil edildi.

Bu çalışma, Helsinki Deklarasyonu Prensipleri'ne uygun olarak yapılmış ve İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 02 Haziran 2015 tarih ve 171702 karar numarası ile etik kurul onamı alınmıştır.

Hasta grubu seçimi: 5AR2E ön tanısı alan, 46,XY genotipine sahip, dış genital anomalisi olan, beta insan koryonik gonadotropin [human chorionic gonadotropin (HCG)] uyarısına normal testosteron yanıtı veren, T/DHT oranı 8'in üzerinde tespit edilen, kromozomal anomaliye veya 5ARE2'ye benzer bulgulara yol açabilecek bir endokrinopatiye sahip olmayan ve *SRD5A2* geninde mutasyon saptanmayan hastalar çalışmaya dâhil edildi.

Kontrol Grubu Seçimi: Değişik nedenlerle polikliniğimize başvuran 12 sağlıklı ve gönüllü bireyden kontrol grubu oluşturuldu.

Karyotip Analizi: Hastaların karyotip analizi yüksek çözünürlüklü bantlama (HRB) yöntemi ile yapıldı.

DNA İzolasyonu: Hasta ve kontrol grubunun periferik venöz kan örneklerinden DNA eldesi EZ1 DNA Blood 200 µl Kit (katolog no: 951034, Qiagen) ile otomatize şekilde yapıldı.

Dizi Analizi: *SRD5A2* geninin ENST00000405650 no.lu transkripti baz alınarak, 5 ekzon ve ekzon/intron bileşke bölgelerini kapsayacak şekilde primerler dizayn edilip, otomatik jel elektroforezi (ABI 3500 genetik analizör applied biosystems) kullanılarak çift yönlü dizi analizi yapıldı.

Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Metilasyon Spesifik Pirosekans: Çalışmaya alınan DNA örnekleri EpiTect Bisulfite Kit (katolog no: 59104, Qiagen) ile bisülfid modifikasyona uğratılıp PyroMark PCR Kit (katolog no: 978703, Qiagen) ve custom assay primerler (Qiagen katolog no: 978776) ile amplifiye edildi. PyroMark Q24 Advanced CpG Kit ile pirosekans reaksiyonu gerçekleştirilerek analiz yapıldı. *SRD5A2* geninin promotor bölgesinde bulunan 223 bazlık bölge içerisinde yer alan; “GGCGGGCGAACTAAGA-AGGCCTTCGTTCTCCTCCGGCCACCGCGGT” dizisindeki 6 CpG adacığindeki metilasyon değişiklikleri belirlendi.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Kontrol grubundan elde edilen verilerin ortalaması baz alınarak hasta grubunun verileri değerlendirildi. İki grup arasındaki fark Mann-Whitney’s U testi kullanılarak analiz edildi ve p değeri 0,05’in altında ise anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Hasta grubunda yer alanların yaş aralığı 1-184 ay, kontrol grubunda yer alanların yaşları ise 53-130 ay arasında değişmekteydi. Hasta grubunda yer alan ve karyotipi 46,XY olan 12 hastanın 6 (%50)’sında mikropenis, 4 (%33)’ünde izole hipospadias, 1 (%8)’inde

dişi fenotip, 1 (%8)’inde ambigus genitalya belirlendi. Hastaların 4’ünde akraba evliliği mevcuttu.

H1 no.lu hastada FSH değeri ve H11 no.lu hastada LH değeri yaşla uygun standart değerlerin hafif üzerinde saptandı. Diğerlerinde FSH ve LH değerleri normal sınırlar içerisindeydi. Hastalara uygulanan HCG stimülasyonu sonrası alınan kan örneklerinde uT/uDHT oranı 8,3-107 arasında değişmekteydi. Uyarı testi yapılan tüm hastalarda 2 katın üzerinde testosteron yanıtı alındı. Hastaların klinik bulguları **Tablo 1**’de belirtilmiştir.

Karyotip analizinde hastaların tümünde 46,XY kromozom yapısı saptandı. *SRD5A2* geninin tüm ekzonları ve ekzon/intron birleşkeleri Sanger dizileme yöntemi ile analiz edildi ve hastaların hiçbirinde mutasyon saptanmadı.

Hasta ve kontrol grubunun *SRD5A2* geni promotor bölgesinde 6 adet CpG adası metilasyon değişiklikleri incelendiğinde; hasta grubunda, 1. bölgede 19-41, 2. bölgede 19-38, 3. bölgede 14-32, 4. bölgede 10-29, 5. bölgede 9-20, 6. bölgede 0-9 arasında; kontrol grubunda ise 1. bölgede 0-69, 2. bölgede 2-37, 3. bölgede 2-31, 4. bölgede 0-24, 5. bölgede 2-49, 6. bölgede 0-20 arasında tespit edildi. Hasta grubunda 6 bölgenin ortalama değerleri, sırasıyla 1. bölgede 29,75, 2. bölgede 26,25, 3. bölgede 21, 4. bölgede 18,4, 5. bölgede 12, 6. bölgede 5,83 olarak bulundu.

TABLO 1: Hastaların klinik bulguları.

Hasta	Yaş (ay)	Akrabalık	Karyotip	Dış genital	İç genital	Penis gb. (cm)/p.	Testis/ t.volümü (cc)	<i>SRD5A2</i> geni
H1	108	1. kuzen	46,XY	Dişi	Erkek	.	+ ?	Mutasyon yok
H2	48	1. kuzen	46,XY	Hipospadias inmemiş testis Mikropenis	Erkek	4/<3p	+ 2/2	Mutasyon yok
H3	7	Yok	46,XY	Hipospadias	Erkek	3/3-10p	+ 2/2	Mutasyon yok
H4	48	Yok	46,XY	Hipospadias	Erkek	5/10p	+ 1/1	Mutasyon yok
H5	16	Yok	46,XY	Hipospadias	Erkek	4.5/25p	+ 2/2	Mutasyon yok
H6	30	Yok	46,XY	Hipospadias	Erkek	4.5/3-10	+ 2/2	Mutasyon yok
H7	184	Yok	46,XY	Mikropenis	Erkek	6.5/<3p	+ 3/3	Mutasyon yok
H8	2	2. kuzen	46,XY	Hipospadias mikropenis	Erkek	2.5/<3p	+ 0.5/0.5	Mutasyon yok
H9	116	1. kuzen	46,XY	İnmemiş testis mikropenis	Erkek	5/<3p	+ 1/1	Mutasyon yok
H10	96	Yok	46,XY	Mikropenis inmemiş testis	Erkek	3.5/<3p	+ 1/2	Mutasyon yok
H11	1	Yok	46,XY	Ambigus genitalya	Erkek	1.5	+ ?	Mutasyon yok
H12	11	Yok	46,XY	Hipospadias mikropenis	Erkek	1.5/<3p	+ 2/2	Mutasyon yok

p: Persentil; gb: Germe boyu; t: Testis.

Kontrol grubunda ise sırasıyla 1. bölgede 29,25, 2. bölgede 22,5, 3. bölgede 18,3, 4. bölgede 15,58, 5. bölgede 13,58, 6. bölgede 6,08 olarak hesaplandı. H2, H4, H7, H9, H12 no.lu hastaların metilasyon oranları kontrol grubunun ortalamasından yüksek bulundu. Diğer hastaların ortalamaları ise kontrol grubundan farklı değildi. Tüm hasta grubunun metilasyon ortalaması kontrol grubunun metilasyon ortalamasından yüksekti. Fakat, CpG adacıklarının metilasyon değerleri bölgeye özgü olarak tek tek incelendiğinde; 1. CpG adacığında 5 hastanın, 2. CpG adacığında 8 has-

tanın, 3. CpG adacığında 8 hastanın, 4. CpG adacığında 8 hastanın, 5. CpG adacığında 3 hastanın, 6. CpG adacığında 5 hastanın metilasyon değerleri kontrol grubu ortalamasından yüksek bulundu. Tüm hasta grubunda 5 hastanın metilasyon oranı (23) kontrol grubu ortalamasından (17,5) yüksek olup, adacık bazında incelendiğinde 8 hastanın metilasyon oranları 2, 3, 4. adacıklarda (sırasıyla 29, 24, 21) kontrol grubu ortalamasından (sırasıyla 22, 18, 15) daha yüksek bulundu. Kontrol ve hasta grubunun metilasyon oranları [Tablo 2](#) ve [Tablo 3](#)'te gösterilmiştir.

TABLO 2: Hastaların metilasyon oranları ve ortalama değerleri.

Hasta	1. CpG%	2. CpG%	3. CpG%	4. CpG%	5. CpG%	6. CpG%	Ort
H1	33	24	19	14	9	5	17,3
H2	32	32	25	21	15	7	22
H3	22	20	15	17	11	8	15,5
H4	29	27	22	20	10	0	18
H5	19	19	14	10	10	6	13
H6	29	24	21	17	9	4	17,3
H7	38	31	22	21	12	8	22
H8	29	24	18	16	9	5	16,83
H9	39	34	28	29	18	9	26,17
H10	19	20	19	15	12	5	15
H11	27	22	17	14	9	5	15,67
H12	41	38	32	27	20	8	27,67
Ort	29,75	26,25	21	18,4	12	5,83	18,87

TABLO 3: Olguların metilasyon oranları ve ortalama değerleri.

Kontrol	1. CpG%	2. CpG%	3. CpG%	4. CpG%	5. CpG%	6. CpG%	Ort
K1	27	24	25	20	15	6	19,5
K2	69	2	2	2	2	0	12,83
K3	36	33	21	19	12	6	21,16
K4	37	34	31	23	14	9	24,67
K5	20	20	17	16	10	6	14,83
K6	0	6	6	0	5	0	2,83
K7	21	23	15	14	9	5	14,5
K8	24	22	15	12	9	3	14,17
K9	26	21	17	15	12	5	16
K10	39	37	26	22	13	8	24,17
K11	26	23	21	20	13	5	18
K12	26	25	24	24	49	20	28
Ort	29,25	22,5	18,3	15,58	13,58	6,08	17,56

TARTIŞMA

5AR2E; nadir karşılaşılan bir endokrinopati olup, prevalansı tam olarak bilinmemektedir.⁵ Hastalığın tanımlandığı ve en çok görüldüğü ülke olan Dominik Cumhuriyeti dışında; Güney Lübnan, Papua Yeni Gine ve Türkiye olmak üzere birkaç ülkede 50'den fazla *SRD5A2* mutasyonuna sahip aile bildirilmiştir.^{5,9} Yapılan literatür taramasında, Türkiye'den 1986 yılında 12, 1989 yılında 7, 2003 yılında 1, 2005 yılında 2 olmak üzere toplamda 22 hasta bildirilmiştir.¹⁰⁻¹³ Ancak, 1986 ve 1989 yılındaki hastalarda genetik analiz yapılmadığı ve sadece klinik ve biyokimyasal parametrelerle tanı konulduğu bildirilmiştir.^{10,11}

Bu çalışma, 5 alfa redüktaz enzim eksikliği tanısı alan *SRD5A2* geninde mutasyon saptanmayan 12 hastada ve 12 sağlıklı gönüllü bireyde yapılmıştır. Çalışmaya dâhil edilen 12 hastanın 5'inde metilasyon oranları kontrol ortalamasının üzerinde tespit edilmiş olup, bu hastaların çoğunda hipospadias ve mikropenis gibi hafif klinik bulgular mevcuttu. Bölgeye özgü CpG adacıklarının metilasyon değerleri ise 8 hastanın 2, 3, 4. CpG adacığında metilasyon oranlarının kontrol grubu ortalamasından yüksek olduğu saptandı. Bu hastaların inmemiş testis, mikropenis ve hipospadias yakınmalarıyla başvurduğu belirlendi.

Literatürde, klinik bulgularla 5AR2E ön tanısı konularak izlenen hastalarda, *SRD5A2* geni promotor bölgesinin metilasyon değişikliğini gösteren ve bu tip değişikliklerin hastalığa yol açtığını belirten bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, Rodríguez-Dorantes ve ark. tarafından, 5AR2E ön tanılı 4 hasta ve 3 kontrol grubunda enzim kesimi, metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)], sodyum bisüfit dizileme yöntemleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, *SRD5A2* geni ekzonik bölgelerindeki metilasyon oranları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hipermetilasyon saptandığı bildirilmiştir.¹⁴

SRD5A2 geninde hipermetilasyon saptanan diğer bir çalışmada, hepatoselüler kanserli dokularda gen ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu gösterilmiştir.⁷ Moribe ve ark. tarafından yapılan çalışmada, tümör olmayan sağlıklı karaciğer dokusundan alınan DNA örneklerinde, *SRD5A2* geni promotor bölgesi

pirosekans yöntemiyle analiz edilerek metilasyon ortalaması 19,3-29,9 arasında bulunmuştur. Bu hastalardan alınan tümöre ait doku örneklerinde ise metilasyon oranının 25,1-52,1 arasında değiştiği, tümör dokusu ile sağlıklı doku arasındaki ekspresyon düzeylerinde 1-5 kat arasında azalma olduğu bildirilmiştir. Ekspresyonda azalma saptanan tümürlü dokuların metilasyon oranları, sağlıklı dokular ile kıyaslandığında %20'ye varan artış tespit edilmiştir.⁸ Mevcut çalışmada ise hasta grubunda metilasyon ortalamaları 18,87±4,3; kontrol grubunda 17,55±6,3 arasında değişmekteydi. Karaciğer dokusu ile periferik kan örneği ve sağlıklı karaciğer dokusu ile kontrol grubunda saptanan *SRD5A2* geni metilasyon oranlarının birbirine yakın olduğu görüldü.

5 alfa redüktaz enzim eksikliği tanısı için en önemli yöntem, genital cilt fibroblast kültürü enzim analizidir. Ancak; fibroblast kültürü enzim analizinin invaziv olması, etik problemler oluşturması, yüksek maliyeti ve uzun zaman alması nedeni ile pratikte artık kullanılmamaktadır. Günümüzde bu hastalara *SRD5A2* geni mutasyon analizi ile tanı konulabilmektedir. Ancak, bazı hastaların *SRD5A2* geni dizi analizinde mutasyon tespit edilememektedir. *SRD5A2* geni dizi analizinde mutasyon tespit edilememesinin bir nedeni de homozigot delesyonlardır. Hastalarımızın tamamında PCR ürünü elde edilmiş olması, homozigot delesyon bulunmadığını göstermiştir. Ayrıca, literatürde hastalığın büyük delesyonlardan da kaynaklanabileceği belirtilmektedir.¹³ Hastalarımızda HRB tekniğiyle kromozom analizi yapılarak 3-4 Mb'dan büyük delesyonlar ekarte edilmiştir. Çalışmaya alınan hastalar belirlenirken 1000 bazın altındaki delesyonlar dizi analizi ile dışlanmıştır. İntronik bölge mutasyonlarının da gen fonksiyonlarını değiştirebileceği düşünülerek, ekzon/intron bileşkesine yakın intronik bölgeler de analiz edilmiş, herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir. Diğer taraftan, *SRD5A2* geninin ekspresyonunu düzenleyen genlerdeki mutasyonların da teorik olarak benzer klinik bulgulara yol açabilme olasılığı vardır. Ancak, literatürde bu tür modülatör gen mutasyonları henüz bildirilmemiştir. Bu nedenlerle *SRD5A2* geni dizi analizinde mutasyon tespit edilememesi hastalığı dışlamamaktadır. Genetik hastalıkların nedeni, sadece DNA dizisinde meydana gelen değişimler olmayıp, epigenetik mekanizmalara

rın da gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı ve hastalık nedeni olduğu bilinmektedir. Epigenetik mekanizmalardan en iyi bilineni DNA metilasyonudur.

Günümüze kadar daha çok malignite analizleriyle gündeme gelen metilasyon değişiklikleri, bu çalışmada klinik ve laboratuvar bulgularıyla 5AR2E olduğu düşünülen ve *SRD5A2* geninde mutasyon saptanmayan hastalarda çalışıldı. *SRD5A2* geni promotör bölgesinde yer alan 6 CpG adacığın metilasyon değişikliklerinde hasta grubu ile kontrol grubu ortalamaları arasında önemli bir farklılık bulunamadı. Bu durum, hasta grubunda metilasyonu yüksek bulunanların kontrol grubu yaş ortalamasına yakın olmasından kaynaklanmış olabilir. Ancak, CpG adacıkları tek tek ele alındığında, hasta grubunda 2, 3 ve 4. CpG adacığındaki metilasyon oranlarının kontrol grubu ortalamasına göre yüksek, yaşlarının ise diğer hastalardan büyük olduğu görüldü.

SONUÇ

Çalışma sonuçları, literatürde belirtilen metilasyon değişimlerinin yaşla korele olduğu bilgisine uyumludur.¹⁵ Ayrıca, hasta sayısının sınırlı olması istatistiksel analizlerinin duyarlılığını azaltabilir. Hasta sayısının artırılarak benzer çalışmaların yapılması hâ-

linde, bu yöntemin 5 alfa redüktaz Tip 2 enzim eksikliği ön tanısıyla takip edilen, değişik nedenlerle genital cilt fibroblast kültüründe enzim analizi yapılamayan ve DNA dizi analizinde mutasyon bulunmayan bu hastalarda metilasyon değişikliklerinin değerlendirilmesinin hastalığın genetik etiolojisinin aydınlatılmasında yararlı olacağı düşünülmektedir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyonu birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 54850.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Emre Kirat, Mehmet Seven; **Tasarım:** Emre Kirat; **Denetleme/Danışmanlık:** Mehmet Seven; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Emre Kirat, Mehmet Seven; **Analiz ve/veya Yorum:** Aysel Kalaycı Yiğın, Filiz Özdemir; **Kaynak Taraması:** Aysel Kalaycı Yiğın, Filiz Özdemir, Emre Kirat; **Makalenin Yazımı:** Aysel Kalaycı Yiğın, Filiz Özdemir, Mehmet Seven; **Eleştirel İnceleme:** Mehmet Seven; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Mehmet Seven; **Malzemeler:** Emre Kirat.

KAYNAKLAR

- Allen L. Disorders of sexual development. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2009;36(1):25-45. [Crossref] [PubMed]
- McCann-Crosby B, Sutton VR. Disorders of sexual development. *Clin Perinatol.* 2015;42(2):395-412. [Crossref] [PubMed]
- Sinnecker GH, Hiort O, Dibbelt L, Albers N, Dörr HG, Hauss H, et al. Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Am J Med Genet.* 1996;63(1):223-30. [Crossref] [PubMed]
- Boudon C, Lumbroso S, Lobaccaro JM, Szarras-Czapnik M, Romer TE, Garandeau P, et al. Molecular study of the 5 alpha-reductase type 2 gene in three European families with 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(7):2149-53. [Crossref] [PubMed]
- Hiort O (author), Synder PJ, Matsumoto AM (section editor), Martin KA (deputy editor). *Steroid 5-alpha-reductase 2 deficiency.* UpToDate; 2014. [Link]
- Doerfler W, Böhm P, SpringerLink (Online service). *DNA Methylation: Development, Genetic Disease and Cancer.* 1st ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2006. p.284. [Crossref]
- Tsunedomi R, Ogawa Y, Iizuka N, Sakamoto K, Tamesa T, Moribe T, et al. The assessment of methylated *BASP1* and *SRD5A2* levels in the detection of early hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 2010;36(1):205-12. [Crossref] [PubMed]
- Moribe T, Iizuka N, Miura T, Stark M, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, et al. Identification of novel aberrant methylation of *BASP1* and *SRD5A2* for early diagnosis of hepatocellular carcinoma by genome-wide search. *Int J Oncol.* 2008;33(5):949-58. [PubMed]
- Orphanet. The portal for rare diseases and orphan drugs. [Internet]. [Link]
- Akgun S, Ertel NH, Imperato-McGinley J, Sayli BS, Shackleton C. Familial male pseudohermaphroditism due to 5-alpha-reductase deficiency in a Turkish village. *Am J Med.* 1986;81(2):267-74. [Crossref] [PubMed]
- Ertel NH, Akgun S, Samojlik E, Kirschner MA, Imperato-McGinley J. Decreased 3 alpha-androstenediol glucuronide levels in plasma and random urines in male pseudohermaphroditism caused by 5 alpha-reductase deficiency. *Metabolism.* 1989;38(9):817-21. [Crossref] [PubMed]
- Yücel B, Polat A. A late sex reassignment in 5-alpha reductase deficiency: case report. *Int J Psychiatry Med.* 2003;33(2):189-93. [Crossref] [PubMed]
- Bahceci M, Ersay AR, Tuzcu A, Hiort O, Richter-Unruh A, Gokalp D. A novel missense mutation of 5-alpha reductase type 2 gene (*SRD5A2*) leads to severe male pseudohermaphroditism in a Turkish family. *Urology.* 2005;66(2):407-10. [Crossref] [PubMed]
- Rodríguez-Dorantes M, Téllez-Ascencio N, Cerbón MA, López M, Cervantes A. [DNA methylation: an epigenetic process of medical importance]. *Rev Invest Clin.* 2004;56(1):56-71. [PubMed]
- Guest PC. Reviews on Biomarker Studies in Aging and Anti-Aging Research. Chapter 10. 1st ed. Campinas, Brazil: Springer Nature; 2019. p.279.