



Türk Hastalarda Prematür Over Yetmezliği ile İlişkili Genlerin Taranması

Screening of Premature Ovarian Insufficiency-Associated Genes in Turkish Patients

Emine İkbal ATLI, Hakan GÜRKAN, Sinem YALÇINTEPE, Selma DEMİR, Hazal SEZGİNER GÜLER, Drenushe ZHURİ, Engin ATLI, Koray ELTER, Sinan ATEŞ

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

ÖZ

Amaç: İnfertilite esas olarak prematür over yetmezliğinden (POI) kaynaklanır. POI'nin genetik temelinde birden fazla gen bulunduğundan, durumun genetik incelemesi klinik tanının bir bileşeni olmalıdır. Araştırmamızın amacı, POI'nin genetik geçmişini bir Türk kohortunda analiz etmektir. **Gereç ve Yöntem:** Başlangıç yaşı 18 ila 39 arasında değişen hastalar çalışmaya dahil edildi. Her hasta POI ile ilişkili Fajil X ön mutasyonu premutasyonu için önceden tarandı ve karyotipler 46,XX idi. Genetik değişiklikleri tespit etmek için POI ile bağlantılı 26 genin yeni nesil dizilemesi (NGS) aralarında akrabalık bulunmayan 68 bireyde gerçekleştirildi.

Bulgular: Hastalığın olası nedensel varyasyonlarını bulmak için hedefli panel dizilemesini kullanmak amacıyla 68 akrabalık ilişkisi bulunmayan POI hastasının DNA örneklerini inceledik. Hasta grubunda POI ile ilişkili 3 gende 3 heterozigot klinik önemi bilinmeyen varyant ve bir heterozigot olası patojenik varyasyon saptanmıştır. Bu varyantlar 3 genle ilişkiliydi: *Yenidoğan yumurtalık homeoboks geni (NOBOX)*, GDF9 ve STAG3.

Sonuç: POI, giderek artan sayıda gen ve çeşitli fenotipik özelliklerle karmaşık bir genetik geçmişe sahiptir. Bu, POI ile ilgili 26 adet genin etkisine odaklanan Türkiye'nin ilk genetik epidemiyoloji çalışmasıdır. Hasta grubumuzda tespit ettiğimiz varyasyonlar arasında, STAG3 geninde tespit ettiğimiz varyasyon daha önce bildirilmemiştir. NOBOX geninde 2 hastada 2 ayrı varyasyon saptanmıştır. Son olarak GDF9 geninde bir adet varyasyon saptanmıştır. STAG3 genindeki varyasyon olası patojenik olarak sınıflandırılmıştır. NOBOX ve GDF6 genlerindeki varyasyonlar klinik önemi bilinmeyen sınıfında yer almaktadır. İnsan folikülogenezini yöneten karmaşık ağ nedeniyle, bireysel hastalar önemli fenotipik çeşitlilik göstermektedir ve bu durum POI tanısına yardımcı olmak için dizileme yöntemlerinin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. NGS taramasının kapsamını daha önce infertilite ile ilişkilendirilen genleri de kapsayacak şekilde genişletmek, POI için daha kesin, hızlı ve uygun fiyatlı genetik tanılamalara olanak sağlayabilir. Hastaların genomik analizi klinik karar almada yardımcı olabilir ve yaklaşan klinik denemeler ve tedaviler için kapıyı açabilir.

Anahtar Kelimeler: Prematüre over yetmezliği, genetik araştırma, yeni nesil dizileme

ABSTRACT

Aim: Infertility is primarily caused by premature ovarian insufficiency (POI). Since multiple genes have been linked to the genetic foundation of POI, the genetic investigation of the condition needs to be a component of the clinical diagnosis. Analyzing the genetic background of POI in a Turkish cohort was the goal of our investigation.

Materials and Methods: The onset age ranged from 18 to 39 years old. Every patient was prescreened for the most common POI-associated fragile-X premutation and had the karyotype 46,XX. Next-generation sequencing (NGS) of 26 genes previously linked to POI was performed on 68 unrelated individuals from Türkiye in order to detect genetic changes.

Results: We examined the DNA samples of 68 unrelated POI patients in order to use targeted panel sequencing to find possible causal variations of the disease. Three POI-related genes in our sample had three heterozygous variants of unclear significance and one heterozygous potentially pathogenic gene. These variants were related to 3 genes: *Newborn ovary homeobox (NOBOX)*, GDF9 and STAG3.

Conclusion: POI is distinguished by a complex genetic background with an increasing number of genes and diverse phenotypic traits. This is the first genetic epidemiology study in Türkiye focusing on the effects of 26 genes related to POI. Among the variations we detected in our patient

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Emine İkbal ATLI, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

E-posta: emine.ikbal@gmail.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0001-9003-1449

Geliş Tarihi/Received: 05.12.2024 **Kabul Tarihi/Accepted:** 17.04.2025 **Yayınlanma Tarihi/Publication Date:** 23.06.2025

Atıf/Cite this article as: Atlı Eİ, Gürkan H, Yalçıntepe S, Demir S, Sezginer Güler H, Zhuri D, et al. Screening of premature ovarian insufficiency-associated genes in Turkish patients. Nam Kem Med J. 2025;13(2):164-169

©Telif Hakkı 2025 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi / Namık Kemal Tıp Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.
©Copyright 2025 by Tekirdağ Namık Kemal University / Namık Kemal Medical Journal is published by Galenos Publishing House.
Creative Commons Atıf-GayriTicari-Türetilemez 4.0 (CC BY-NC-ND) Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.



group, the variation we detected in the *STAG3* gene has not been reported before. Two separate variations were detected in the *NOBOX* gene in two patients. Finally, one variation was detected in the *GDF9* gene. The variation in the *STAG3* gene was classified as likely pathogenic. The variations in the *NOBOX* and *GDF6* genes are classified as of unknown clinical significance. Due to the intricate network governing human folliculogenesis, individual patients exhibit significant phenotypic diversity, necessitating the development of NGS sequencing methods to aid in POI diagnosis.

Keywords: Premature ovarian insufficiency, genetic investigation, next-generation sequencing

GİRİŞ

Prematür over yetmezliği (POI), 40 yaşından önce over fonksiyonunun durmasını ifade etmektedir. 2000'li yılların sonunda, bu prematüre over yaşlanması durumunu daha doğru bir şekilde tanımlamak için POI terimi benimsenmiştir. Bu terminoloji, bu işlev bozukluğuna sahip kadınların zaman zaman kendiliğinden foliküler gelişim, adetlerin geri dönmesi ve hatta tanıdan sonra gebe kalma yaşayabileceğini vurgulamaktadır^{1,2}. POI, over foliküllerinin tükenmesiyle karakterize edilir ve 40 yaşından önce kısırlığa yol açar ve çeşitli klinik fenotiplerle ortaya çıkar³. Bu durum, en az dört ay boyunca adet görmeme (amenore veya oligomenore), yüksek gonadotropin seviyeleri [folikül stimülan hormon (FSH) > luteinize edici hormon] ve hipooöstrojenizm ile tanımlanır⁴. Genellikle ergenliği gecikmiş, meme gelişimi olmayan ve adet görmeyen bireylerde yaşamın erken dönemlerinde tanımlanan birincil amenore, ilk uyarı işareti olabilir. Bununla birlikte, en yaygın POI fenotipi olan ikincil amenore, 20 ila 40 yaşları arasında ortaya çıkar ve normal ergenlik gelişimiyle birlikte düzensiz adet döngüsünü izleyen amenore ile karakterizedir³. Çalışmalar, kadınlar arasında POI'nin küresel genel prevalansının %3,5 olduğunu göstermiştir. Alt grup analizine göre, iatrojenik etiyojisi olan kadınlar arasında POI prevalansı %11,2 idi, bunu otoimmünite (%10,5) takip ediyordu; bölgelere göre POI prevalansı %11,3 ile Kuzey Amerika'da en yüksekti, bunu Güney Amerika (%5,4) takip ediyordu; ve POI prevalansı gelişmekte olan bir ülkede %5,3 ile, gelişmiş bir ülkedeki %3,1'den daha yüksekti. POI prevalansının son 20 yıldaki eğilimi artıştıydı ($p > 0,05$ olmasına rağmen)⁵.

Genetik kusurlar, otoimmün bozukluklar, iatrojenik nedenler (kemoterapi veya radyasyon tedavisi gibi), viral enfeksiyonlar, zehirler veya hatta idiyopatik durumlar POI'ye katkıda bulunabilir⁵. Bununla birlikte, etkilenen kadınların çoğunun pozitif bir aile geçmişi vardır. Çeşitli genetik etyolojilere sahip POI, olguların kalıtsal durumunu gösterebilir⁶. Cerrahi, tıbbi, enfeksiyöz veya otoimmün over hasarları POI'nin diğer bilinen nedenleridir⁷.

Genetik faktörler açısından, POI fenotipi kromozomal anormallikler ve monogenik bozuklukların etkisiyle başlayabilir. POI'nin klinik tanısının doğrulanmasının ardından kromozom analizi, fragil-X premütasyon (FMR1) testi, tiroid ve adrenal (21-hidroksilaz) antikorlarının değerlendirilmesi ve pelvik ultrasonografi yapılmalıdır³. Bireylerin yaklaşık %10-13'ü

kromozomal anormallikler sergiler⁸. Kromozomal kökenler açısından, X kromozomu anormallikleri POI olgularının %12'sini oluşturmaktadır. Bu anormallikler monozomi, trizomi, delesyonlar, duplikasyonlar ve X-otozom translokasyonlarını kapsamaktadır⁹. POI ile potansiyel olarak ilişkili olan kritik X kromozomal bölgeleri sitogenetik çalışmalar yoluyla tanımlanmıştır. POI, Xq21.3-q27 bölgesindeki delesyonlar veya Xq13.3-q21.1 bölgesindeki X-otozom translokasyonları ile ilişkilendirilmiştir. Ek olarak, POI, X kromozomunun p kolunun delesyonu ile ilişkilendirilmiştir. Sitogenetik analiz, karyotipleri sayısal değişiklikler açısından değerlendirmek için kullanılabilir ve array karşılaştırmalı genomik dahil olmak üzere çeşitli yöntemler, POI bağlamında kopya sayısı varyantlarını tanımlamak için geliştirilmiştir¹⁰.

Ayrıca, Fragile-X sendromuyla sonuçlanan *FMR1* geninin 5' regülatör bölgesindeki bir sitozin-guanin-guanin tekrarının genişletilmesi de sendromik POI'ye katkıda bulunabilir. *FMR1* premütasyonu etkilenen kadınların yaklaşık %20'sinde POI ile bağlantılı olduğundan, POI tanısı konulan kişilerde varlığı araştırılmalıdır¹¹. Başka bir çalışmada önerildiği gibi, *FMR2* genindeki mikrodelesyonlar da POI'ye önemli ölçüde katkıda bulunabilir¹². POI olgularının çoğunda, altta yatan net bir neden bulunamaz; ancak, bu tarama POI etiyojisini belirlemede yararlı olabilir. Dahil olan genetik bozukluklar arasında yalnızca Turner sendromu ve *FMR1* (Fragile X zihinsel gerilik tip 1) gen premütasyonu değil, aynı zamanda monogenik bozukluklar da bulunur. Karyotip analizi, düşük çözünürlük nedeniyle tüm POI olgularını çözmek için yetersizdir. *FMR1* gen premütasyonu analizi olguların yalnızca bir kısmını çözebildiğinden (%3 ila %15 POI olguları), monogenik gen analizi en doğru yöntem seçimi gibi görünmektedir¹³. Bu nedenle, POI tanısını destekleyecek pozitif bulgulara ulaşamaması durumunda bir sonraki adım monogenik analiz olmalıdır.

İnsan folikülogenezini yöneten karmaşık ağın, çeşitli genetik etiyojilere sahip POI sendromunda önemli fenotipik varyansa yol açtığı göz önüne alındığında, NGS analizi POI için daha doğru, hızlı ve uygun maliyetli bir genetik tanı sunabilir¹⁴⁻². Ayrıca, bu durum için oligogenik kökenleri varsayan bir teori önerilmiş olup, çok genli panel dizilemesinin gerekliliğini vurgulamaktadır^{15,16}. Önceki çalışmalar, bu genlerin dişi cinsiyet kromozomundaki POI1 ve POI2 lokuslarında kümelenmiş olabileceğini öne sürmektedir¹⁷. Birkaç X ve otozom kodlu genin, insan folikülogenezinde rol oynayabilecekleri için POI

için kritik adaylar olduğu öne sürülmektedir. Klinik ortamlarda POI'nin genetik etiyolojisine işlevsel katkılarının daha fazla araştırılmasıyla daha etkili bir tanı yolu geliştirilebilir.

İdiyopatik POI'nin genetik nedenlerine ilişkin anlayışımız yeni nesil dizileme (NGS) döneminde önemli ölçüde artmıştır. İyi bilinen genlerin [*FSHR*, *GDF9*, *BMP15*, *FIGLA* ve *yenidoğan yumurtalık homeoboks geni (NOBOX)*] çok sayıda yeni patojenik varyantı, yüksek verimli dizileme yaklaşımları aracılığıyla POI ile ilişkilendirilmiştir³. Cinsiyet kromozomu yeniden şekillenmesi, metabolizma, otoimmün ilişkiler, mayoz ve DNA onarımı, oogenez, folikülogenez, hormon sinyalizasyonu ve germ hücre gelişimindeki rolleri nedeniyle, bu genlerin POI etiyolojisinde rol oynadığı öne sürülmüştür. Ayrıca, kapsamlı genomik araştırma, şu anda bilinmeyen POI'nin altında yatan ek gen varyantlarının keşfedilmesinin önünü açmaktadır. Artan bilğimiz, POI hastalarının genetik yapısını analiz ederken daha umut verici sonuçlara yol açabilir ve POI'li kadınlar için potansiyel tedavileri keşfetmek için yeni yollar ortaya çıkarabilir. Bu, NGS yönteminin potansiyelinden yararlanan Türk POI hastaları üzerinde bugüne kadar yapılmış tek kapsamlı genomik araştırmadır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Denekler

40 yaşından önce en az altı ay amenore yaşayan ve FSH plazma düzeyleri 40 IU/L'yi aşan, POI tanısı almış Türk-ilişkisiz 68 hasta çalışmaya alındı. Başlangıç yaşı 18 ila 39 arasında değişiyordu. Her hastaya *FMR1* moleküler analizi yapıldı ve en az 20 hücre karyotiplendi. Karyotip veya başka bir karyotip anormalliğine dayanarak Turner sendromu olduğu bulunan hastaları ve *FMR1* premutasyonu olan hastaları hariç tuttuk. Daha önce gonadotoksik tedavi (kemoterapi veya pelvik radyasyon) veya kapsamlı over cerrahisi geçiren hastalar da çalışmadan hariç tutuldu. Tüm bu dışlama kriterleri karşılandıktan sonra NGS analizi yapıldı. Her hasta bilgilendirilmiş onam veren bir belge imzaladı. Yerel etik komitesi, çalışmayı onayladı. İnsan katılımcıları içeren çalışmada gerçekleştirilen tüm prosedürler, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Komitesi tarafından onaylanmış olup (karar no: TüTF-BAEK 2018/319, tarih: 01.10.2018) ve Helsinki Deklarasyonu'na uygun olarak yapılmıştır. Altmış sekiz POI hastasına (P01~P68) hedefli panel dizilemesi yapıldı.

Hedefli Panel Dizilemesi

Amacımız bilinen her POI risk lokusunu kapsamaktı. Literatürdeki bilgilere dayanarak, araştırılan 26 genin bir listesi derlendi (Tablo 1).

Altmış sekiz örnek QIAseq Hedefli DNA Özel Paneli (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak dizilendi. İki mililitre (2 mL) periferik kan toplandı ve antikoagülasyon tüplerinde saklandı. Genomik DNA, EZ1 DNA Araştırma Kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak periferik tam kandan izole edildi. DNA ekstraksiyonundan sonra, hedef diziler özel yakalama probu çipleri (Illumina, San Diego, CA) kullanılarak zenginleştirildi. Bu kit, hastalıkla ilişkili 26 gen içeriyordu. Hedef genleri kapsayan kütüphaneler QIAseq Hedefli DNA Paneli Protokolüne (Qiagen, Hilden, Almanya) göre hazırlandı. Hedef zenginleştirme işleminin ardından, kütüphaneler MiSeq sisteminde (Illumina, San Diego, CA, ABD) dizilendi. Kaliteyi kontrol etmek ve Varyant Çağrı Formatı dosyaları oluşturmak için Obsesif Kompulsif Envanter analiz (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanıldı. Ekzonlardaki nükleotid değişikliklerinin patojenitesinin silico değerlendirmesi, Polimorfizm Fenotipleme v2 (PolyPhen-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT, <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), and MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>) kullanılarak gerçekleştirildi. Minör alel frekansları, Genom Agregasyon Veritabanı gnomAD'de

Tablo 1. Yirmi altı aday gen paneli

Gen adı	Transkript ID	Protein ID
<i>BMP15</i>	NM_005448.2	NP_005439.2
<i>CYP17A1</i>	NM_000102.3	NP_000093.1
<i>CYP19A1</i>	NM_000103.3	NP_000094.2
<i>DIAPH2</i>	NM_007309.3	NP_009293.1
<i>ERCC6</i>	NM_000124.3	NP_000115.1
<i>FIGLA</i>	NM_001004311.3	NP_001004311.2
<i>FMR1</i>	NM_002024.5	NP_002015.1
<i>FOXL2</i>	NM_023067.3	NP_075555.1
<i>FSHR</i>	NM_000145.3	NP_000136.2
<i>GALT</i>	NM_000155.3	NP_000146.2
<i>GDF9</i>	NM_005260.5	NP_005251.1
<i>GNAS</i>	NM_080425.3	NP_536350.2
<i>HFM1</i>	NM_001017975.4	NP_001017975.4
<i>LHCGR</i>	NM_000233.3	NP_000224.2
<i>LMNA</i>	NM_170707.3	NP_733821.1
<i>MCM8</i>	NM_182802.2	NP_877954.1
<i>MSH5</i>	NM_172165.3	NP_751897.1
<i>NOBOX</i>	NM_001080413.3	NP_001073882.3
<i>NR5A1</i>	NM_004959.4	NP_004950.2
<i>POF1B</i>	NM_024921.3	NP_079197.3
<i>POLG</i>	NM_002693.2	NP_002684.1
<i>POR</i>	NM_000941.2	NP_000932.3
<i>PSMC3IP</i>	NM_016556.3	NP_057640.1
<i>STAG3</i>	NM_001282716.1	NP_001269645.1
<i>STAR</i>	NM_000349.2	NP_000340.2
<i>SYCE1</i>	NM_130784.3	NP_570140.1
<i>WT1</i>	NM_024426.4	NP_077744.3

(<http://gnomad.broadinstitute.org/>) kontrol edildi. Varyant analizi Ingenuity yazılımı (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Varyantlar Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Okulu (ACMG) tarafından önerilen standarda göre yorumlandı. Hedef bölge kapsamı 15 okumadan az olduğunda doğrulama için Sanger dizilemesi yapıldı. Nükleotid değişiklikleri Sanger dizilemesi ile analiz edildi ve doğrulandı. Onaylandıktan sonra, her ACMG yönergelerine göre patojenik, muhtemel patojenik, klinik önemi bilinmeyen varyant (VUS), muhtemel iyi huylu veya iyi huylu olarak sınıflandırıldı. Kapsamı 15X'ten az olan kodlama genomik bölgeleri sonunda Sanger teknolojisi kullanılarak yeniden dizilendi. Tespit edilen tüm varyasyonların Sanger dizilemesiyle doğru olduğu doğrulandı.

NGS analizleri, her birey için 68 örnek için çift-uç okumaları olarak yaklaşık ~14,5 GB veri üretti, 97 bp'ye kadar ortalama okuma uzunluğuna sahipti ve hedeflenen bazların yaklaşık %90'ı (0,2 Mb uzunluk) kapsandı, böylece tek nükleotid polimorfizmleri ve kısa eklemeler veya delesyonlar (indeller) için eşiklerimizi yeterince geçti. Sanger dizilimini ABI 3130 (Applied Biosystems, ABD) kapiler elektroforez cihazında gerçekleştirmek ve varyasyon ve segregasyon analizlerini doğrulamak amacıyla tüm gerekli alanlar için primer setler oluşturuldu.

BULGULAR

Hastalığın olası nedensel varyasyonlarını belirlemek için hedefli panel dizilimi kullanarak POI'li altmış sekiz ilgisiz hastanın DNA örneklerini inceledik. Örneğimizde, POI ile ilişkili üç gen klinik önemi bilinmeyen üç heterozigot VUS ve patojenik olabilecek bir heterozigot gen sergiledi. Franklin'in (çevrimiçi olarak <https://franklin.genoox.com> adresinden ulaşılabilir) ve VarSome'un¹⁸ yardımıyla, tanımlanan varyantlar için klinik yorumlama ve çıkarımları ayrıntılı olarak açıkladık. Tanımlanan tüm varyantlar heterozigottu ve çoğu yanlış anlamalı olarak sınıflandırıldı (Tablo 2).

POI hastalarının %1,47'sinde (68'den 1'inde) toplamda bir olası patojenik varyant (STAG3) tanımlandı; bu, POI'nin moleküler genetik tanısı olarak kabul edilir. Toplam hasta grubundan üç hastada iki gende belirsiz öneme sahip VUS tespit edildi. Tanımlanan genler *NOBOX* ve *GDF9* idi. 68 hastadan birinde bir çerçeve kayması tespit edildi.

İstatistiksel Analiz

Hastaların özellikleri elektronik tıbbi kayıtların incelenmesi yoluyla toplandı. Medyanlar, aralıklar ve frekanslar gibi tanımlayıcı istatistikler kullanıldı.

TARTIŞMA

POI, artan genler ve çeşitli fenotipik özellikler ile sağlam bir genetik geçmişe sahiptir³. POI fenotipi, mayoz, DNA onarımı, gonadal gelişim (oogenez ve folikülogenez), hormon sinyalizasyonu, immünolojik fonksiyon ve metabolizmayı etkileyen zararlı gen varyasyonları ile ilişkilidir³. Bu çalışma, bilgimize göre, POI ile ilişkili tek bir panelde 26 gene odaklanan Türkiye'deki ilk genetik epidemiyoloji çalışmasını temsil etmektedir ve bu durumla ilişkili genlerde çeşitli genetik değişiklikler tanımlanmıştır. FMR1 patojenik genişlemesi için ön taramadan geçmiş, POI klinik tanısı almış 68 Türk hasta araştırmamıza dahil edildi.

Hastalarımızdan birinde saptanan NM_001282717.2 (*STAG3*):c.1237_1238insAA varyasyonu, daha önce POI için bildirilmemiş bir çerçeve kayması değişikliğini oluşturmaktadır.

STAG3 tarafından kodlanan kohezin kompleksinin mayoz-spesifik alt birimi, SMC1 α /SMC1 β , SMC3, RAD21/REC8 veya RAD21L'yi içerir¹⁹. Kardeş kromatitleri mitoz ve mayoz sırasında çok proteinli kohezin kompleksi tarafından bir arada tutulur ve bir halka içinde çevrelenir. SMC1 β , REC8 ve RAD21L yalnızca meiotik hücrelerde bulunurken, SMC1 α ve RAD21 her yerde bulunur²⁰. *STAG3* testisler ve yumurtalıkla sınırlı olsa da^{21,22}, *STAG1/2* mitotik hücrelerde bulunur²³. *STAG3* geninin fenotipik etkisi çekinik kalıtım gösterir. Caburet ve ark.²² tarafından yapılan çalışmada, tanımlanan homozigot *STAG3* varyantı premature durdurma kodonuna yol açar ve akraba ebeveynlerin dört kız kardeşinde otozomal resesif kalıtım gösterilmiştir. Daha yakın tarihli başka bir çalışmada, iki dışında POI'ye yol açan *STAG3*'ün homozigot donör splice-site varyantı bildirilmiştir²⁵.

STAG3 heterozigot çerçeve kayması varyasyonunu saptadığımız hastamızda POI dışında bir anomali yoktu. Ancak literatürde *STAG3* genindeki varyasyonların POI'ye katkısı bildirilmiştir. Bulgumuz bu bulguyla tutarlıdır. Ancak *STAG3*'ün çekinik kalıtımı nedeniyle herhangi bir fenotipik etki beklemiyoruz^{13,26}.

Tablo 2. Hedefli panel dizilimi yoluyla 4 POI hastasında bulunan potansiyel nedensel varyantlar

Gen	ACMG	dbSNP ID	Dizileme değişikliği	Type
<i>GDF9</i>	VUS (PM2, PP3)	-	NM_005260.7:c.1297G>A (p.E433K)	Yanlış anlamalı
<i>NOBOX</i>	VUS (PM1, PP3)	rs749172175	NM_001080413.3: c.1067G>A (p.R356Q)	Yanlış anlamalı
<i>STAG3</i>	Likely Pathogenic (PM2, PVS1)	-	NM_001282717.2:c.1237_1238insAA p. (Ile413LysfsTer10)	Çerçeve kayma
<i>NOBOX</i>	VUS (PM2, PP3)	-	NM_001080413.3:c.1788G>C (p.Trp596Cys)	Yanlış anlamalı

POI: Prematür over yetmezliğinden, VUS: Bilinmeyen varyant, ACMG: Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Okulu

Tablo 3. Klinik Özellikler (hasta grubu ortalaması)

Gerçek yaş	29
Amenore	Primer
FSH, IU/L	96,2
LH, IU/L	20,8
E2 pg/mL	16

NOBOX genindeki varyasyonlar iki hastada tanımlandı ve her ikisi de VUS olarak sınıflandırıldı. *NOBOX* geninin POI'ye birincil genetik katkıda bulunanlardan biri olduğuna inanılmaktadır^{27,28}. Bu yumurtalık homeobox geni, *NOBOX* geninin fenotipik etkisinin baskın kalıtım göstermesiyle folikülogenezin erken evrelerinde rol oynar. Hastamızda tespit edilen varyant (rs749172175), ACMG kriterlerine göre VUS olarak tanımlanmasına rağmen, varyant değerlendirme tahmin araçlarında "patojenik" olarak değerlendirilmiştir ve gnomAD veritabanında 0,00000881 olarak verilen alel frekansı bu olasılığı desteklemektedir. *NOBOX* geninde saptadığımız varyasyonlar literatürdeki çalışmalarla tutarlıdır. *NOBOX*'ta saptanan bir diğer varyasyon olan c.1788G>C (p.(Trp596Cys), VUS olarak değerlendirilmiştir. Ancak veritabanlarında patojeniteyi düşündüren değerler mevcuttur (SIFT: Zararlı, CADD (phred): 27.10). Ancak her iki varyasyon da VUS olarak bildirildiğinden klinik önemleri bilinmemektedir²⁹.

Hastalarımızdan birinde *GDF9* geninde VUS olarak sınıflandırılan bir varyasyon belirlendi. Hastanın klinik değerlendirmesi POI ortaya koydu. Qin ve ark.²⁹ ve Jiao ve ark.³⁰ göre, *GDF9*'daki varyasyonlar POI'nin en yaygın 20 genetik nedeni arasında sıklıkla gösterilmektedir. Özellikle, coğrafya ve etnik kökene göre biraz eşitsiz bir dağılımla birlikte, küresel olarak çeşitli *GDF9* varyasyonları bulunmuştur. *GDF9* geninin fenotipik etkisi çekinik kalıtım gösterir. Hastamızdaki *GDF9* varyasyonu hem heterozigot hem de VUS olarak sınıflandırıldığından, fenotipik bir etkiye sahip olma olasılığını düşünmedik. *GDF9*'da tespit edilen c.1297G>A varyasyonu daha önce bildirilmemiştir. Bu nedenle literatürle karşılaştırma yapılamamıştır.

Yüksek verimli yöntemler, aday genlerdeki ve daha önce POI ile ilişkilendirilen genlerdeki yeni varyantları tanımlamak için elzemdir. Kodlanan proteinlerin birincil işlevleri, mayoz ve DNA onarımı, gonadal gelişim (oogenez ve folikülogenez), hormon sinyali, immünolojik yanıt ve metabolizmadır. Birkaç hayvan modelinde gösterildiği gibi, mayoz ve DNA onarımıyla ilişkili genlerdeki değişiklikler, oositlerin dinlenme durumundan dolayı farklı yumurtalık yetersizliği semptomlarına neden olabilir³¹.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamızda bazı sınırlılıkları vardır. Bunlardan birisi hasta sayısıdır. Altmış sekiz hastada %5'ten az sıklıkta nadir varyantları

tespit etmek için çalışma gücü yeterli olmayabilir. Daha fazla hasta sayısı daha fazla sonuç elde edebiliriz. Risk tahmini, rutin tanı ve erken müdahale ortamı, gelecekte hedeflenen sıcak nokta mutasyon panellerinden ve/veya doğrulanmış nedensel genlerden ve tüm ekzom ve tüm genom dizilimi gibi daha geniş analizlerden büyük ölçüde faydalanacaktır.

SONUÇ

POI, birçok nedenden dolayı karmaşık bir genetik varyant dizisine sahip olabilen oldukça çeşitli bir bozukluktur. Ayrıca, fenotipik değişkenlik, POI'nin belirsiz tanımı ve adlandırmasıyla karmaşıklaşır ve bu da POI'nin genetik heterojenliğini daha da kötüleştirir. Over disjenezi, birincil veya ikincil amenore veya erken veya geç başlangıçlı POI gibi farklı fenotiplerin aynı genetik yapıyı paylaşarak paylaşılmadığı belirsizdir, ancak kümülatif etkilere sahiptirler. NGS döneminde belirsiz öneme sahip çok sayıda varyasyon ortaya çıkacaktır. Veri analizi ve filtreleme oldukça zor ancak hayati öneme sahip olacaktır. Nedensel ilişkiyi doğrulamak için mutasyona yönlendirilmiş transgenik modeller veya dönüşüm deneyleri kullanılmalıdır. Ancak, bilinen POI genlerinin birçoğunun kendi başlarına eksik penetrens veya değişken ifade özellikleri sergilerken uyumlu bir şekilde çalıştığı görüldüğünden, herhangi bir POI hastasında tek bir genetik değişikliği "nedensel" olarak tanımlamak giderek zorlaşmaktadır. Genetik ve fenotip arasındaki ilişki daha fazla araştırma gerektirmektedir.

POI açısından kimin risk altında olduğunu belirlemek hala zordur. NGS teknolojilerinin klinik pratikteki potansiyeli çok büyüktür.

Etik

Etik Kurul Onayı: İnsan katılımcıları içeren çalışmada gerçekleştirilen tüm prosedürler, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Komitesi tarafından onaylanmış olup (karar no: TÜTF-BAEK 2018/319, tarih: 01.10.2018) ve Helsinki Deklarasyonu'na uygun olarak yapılmıştır.

Hasta Onayı: Çalışmaya katılan tüm katılımcılardan aydınlatılmış onam alındı.

Teşekkür

Bu çalışmaya katılan tüm katılımcılara teşekkür ediyoruz.

Dipnot

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: H.G., S.Y., K.E., S.A., Konsept: H.G., E.A., K.E., S.A., Dizayn: E.İ.A., Veri Toplama veya İşleme: E.İ.A., H.G., S.Y., H.S.G., D.Z., E.A., Analiz veya Yorumlama: E.İ.A., S.D., Literatür Arama: E.İ.A., Yazan: E.İ.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Makalenin konusu olan çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 2019/278 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Yazar(lar) bu makalenin araştırılması, yazarlığı ve/veya yayımlanması için finansal destek aldıklarını beyan ederler.

KAYNAKLAR

1. Rebar RW, Connolly HV. Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil Steril*. 1990;53:804-10.
2. Nelson LM, Anasti JN, Kimzey LM, Defensor RA, Lipetz KJ, White BJ, et al. Development of luteinized graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79:1470-5.
3. França MM, Mendonça BB. Genetics of primary ovarian insufficiency in the next-generation sequencing era. *J Endocr Soc* 2019;4:37.
4. Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, Braat D, Cartwright B, et al. ESHRE guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod*. 2016;31:926-37.
5. Li M, Zhu Y, Wei J, Chen L, Chen S, Lai D. The global prevalence of premature ovarian insufficiency: a systematic review and meta-analysis. *Climacteric*. 2023;26:95-102; Conway GS. Premature ovarian failure. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1997;9:202-6.
6. Qin Y, Jiao X, Simpson JL, Chen ZJ. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update*. 2015;21:787-808.
7. Oral E, Toksoy G, Sofiyeva N, Celik HG, Karaman B, Basaran S, et al. Clinical and genetic investigation of premature ovarian insufficiency cases from Turkey. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2019;48:817-23.
8. Tamhankar PM, Tamhankar VP, Vaniawala S. Genetics of premature ovarian insufficiency. *Fertility Science and Research*. 2024;11:6.
9. Bestetti I, Castronovo C, Sironi A, Caslini C, Sala C, Rossetti R, et al. High-resolution array-CGH analysis on 46,XX patients affected by early onset primary ovarian insufficiency discloses new genes involved in ovarian function. *Hum Reprod*. 2019;34:574-83.
10. Sullivan SD, Welt C, Sherman S. FMR1 and the continuum of primary ovarian insufficiency. *Semin Reprod Med*. 2011;29:299-307.
11. Murray A, Webb J, Dennis N, Conway G, Morton N. Microdeletions in FMR2 may be a significant cause of premature ovarian failure. *J Med Genet*. 1999;36:767-70.
12. França MM, Funari MFA, Lerario AM, Santos MG, Nishi MY, Domenice S, et al. Screening of targeted panel genes in Brazilian patients with primary ovarian insufficiency. *PLoS ONE*. 2020;15:0240795.
13. Eskenazi S, Bachelot A, Hugon-Rodin J, Plu-Bureau G, Gompel A, Catteau-Jonard S, et al. Next generation sequencing should be proposed to every woman with "idiopathic" primary ovarian insufficiency. *J Endocr Soc*. 2021;5:bvab032.
14. Frank M, Prenzler A, Eils R, Graf von der Schulenburg JM. Genome sequencing: a systematic review of health economic evidence. *Health Econ Rev*. 2013;3:29.
15. Fonseca DJ, Patiño LC, Suárez YC, de Jesús Rodríguez A, Mateus HE, et al. Next generation sequencing in women affected by non-syndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations. *Fertil Steril*. 2015;104:154-62.
16. Fassnacht W, Mempel A, Strowitzki T, Vogt P. Premature ovarian failure (POF) syndrome: towards the Molecular Clinical Analysis of its genetic complexity. *Curr Med Chem*. 2006;13:1397-410.
17. Knight AK. Explaining the unexplained: new genetic mutations in unexplained premature ovarian insufficiency. *FS Rep*. 2020;1:168-9.
18. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019;35:1978-80.
19. Nishiyama T. Cohesion and cohesin-dependent chromatin organization. *Curr Opin Cell Biol*. 2019;58:8-14.
20. Ward JD, Sutton PC, Werner AD, Costanza R, Mohr SH, Simmons CT. Is Decoupling GDP Growth from Environmental Impact Possible? *PLoS One*. 2016;11:164733.
21. Xiao WJ, He WB, Zhang YX, Meng LL, Lu GX, Lin G, et al. In-frame variants in STAG3 gene cause premature ovarian insufficiency. *Front Genet*. 2019;10:1016.
22. Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, et al. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med*. 2014;370:943-9.
23. Carramolino L, Lee BC, Zaballos A, Peled A, Barthelemy I, Shav-Tal Y, et al. SA-1, a nuclear protein encoded by one member of a novel gene family: molecular cloning and detection in hemopoietic organs. *Gene*. 1997;195:151-9.
24. Bouilly J, Bachelot A, Broutin I, Touraine P, Binart N. Novel NOBOX loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Hum Mutat*. 2011;32:1108-13.
25. He WB, Banerjee S, Meng LL, Du J, Gong F, Huang H, et al. Whole-exome sequencing identifies a homozygous donor splice-site mutation in STAG3 that causes primary ovarian insufficiency. *Clin Genet*. 2018;93:340-4.
26. Heddar A, Dessen P, Flatters D, Misrahi M. Novel STAG3 mutations in a Caucasian family with primary ovarian insufficiency. *Mol Genet Genomics*. 2019;294:1527-34.
27. Jiao X, Ke H, Qin Y, Chen ZJ. Molecular genetics of premature ovarian insufficiency. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29:795-807.
28. Luo W, Ke H, Tang S, Jiao X, Li Z, Zhao S, et al. Next-generation sequencing of 500 POI patients identified novel responsible monogenic and oligogenic variants. *J Ovarian Res*. 2023;16:39.
29. Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A. NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet*. 2007;81:576-81.
30. Jiao SY, Yang YH, Chen SR. Molecular genetics of infertility: loss-of-function mutation in humans and corresponding knockout/mutated mice. *Hum Reprod Update*. 2021;27:154-189.
31. Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, Livera G, Monniaux D, Persani L, et al. Advances in the Molecular Pathophysiology, Genetics, and treatment of primary ovarian insufficiency. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29:400-19.