



EGE ÜNİVERSİTESİ

DOKTORA TEZİ

**PODOSİTOPATİLERDEN
NEFROTİK SENDROMDAKİ
PROTEİNÜRİ İLE PODOSİT GENLERİNİN
MUTASYON VE EKSPRESYON İLİŞKİSİ**

Günel ALİZADA

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Sabire KARAÇALI

İkinci Danışmanı : Prof.Dr. Afig BERDELİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.02.00

Sunuş Tarihi: 17.07.2013

Bornova-İZMİR

2013

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**PODOSİTOPATİLERDEN
NEFROTİK SENDROMDAKİ
PROTEİNÜRİ İLE PODOSİT GENLERİNİN
MUTASYON VE EKSPRESYON İLİŞKİSİ**

Günel ALİZADA

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Sabire KARAÇALI

İkinci Danışmanı : Prof.Dr. Afig BERDELİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.02.00

Sunuş Tarihi: 17.07.2013

Bornova-İZMİR

2013

Günel ALİZADA tarafından Doktora tezi olarak sunulan "Podositopatilerden Nefrotik Sendromdaki Proteinüri ile Podosit Genlerinin Mutasyon ve Ekspresyon İlişkisi" başlıklı bu çalışma E.Ü. Doktora Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 17/07/2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:**İmza**

Jüri Başkanı :
Raportör Üye :
Üye :
Üye :
Üye :

ÖZET**PODOSİTOPATİLERDEN NEFROTİK SENDROMDAKİ
PROTEİNÜRİ İLE PODOSİT GENLERİNİN
MUTASYON VE EKSPRESYONİLİŞKİSİ**

ALİZADA, Günel

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof Dr. Sabire KARAÇALI

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Afig BERDELİ

Temmuz 2013, 73 sayfa

Nefrotik sendrom (NS), glomerüler kapiller duvarın seçici geçirgenliğinin değişmesi ve idrarda protein kaçağını önleyen rolünü kaybetmesi ile karakterize olan çocukluk çağı kronik hastalığıdır. Çocukluk çağı idiopatik nefrotik sendromun yönetiminde ve izleminde patolojik tanı kadar tedaviye klinik yanıt da önemlidir. Tüm patolojik tipleri steroid tedavisine gösterdiği yanıt ile steroid duyarlı, bağımlı ve dirençli olarak sınıflandırılır. Steroid dirençli nefrotik sendromlarda kronik böbrek yetmezliğine ilerleme siktir ve SRNS grubu hastalar içinde transplantasyon sonrası renal greftte hastalık rekürrensi oluşabilmektedir. Podosit hücreleri slit membranın üzerinde yeni bir protein belirlenmiştir ve bu proteini kodlayan gen haritalanmış ve TRPC6 olarak isimlendirilmiş olan bir kalsiyum kanal reseptörüdür ve mutasyonunun FSGS tip 2 ye yol açtığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, Türk popülasyonunda nefrotik sendromlu hastalarda TRCP6 gen mutasyon taramasının yapılması ve fenotipe ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 50 SRNS, 25 sağlıklı kontrol bireyler dahil edilmiştir. TRPC6 gen mutasyon taraması tüm ekzonlarda direkt DNA dizi analizi ile yapılmıştır. Yapılmış çalışma sonucunda hiç bir mutasyona saptanmamıştır.

Anahtar kelimeler: Steroide Dirençli Nefrotik Sendrom (SDNS), Fokal Segmental Glomeruloskleroz (FSGS), Minimal Lezyon Hastalığı (MLH), TRPC6

ABSTARCT**RELATION BETWEEN PROTEINURIA AND PODOCYTE GENE
MUTATIONS AND EXPRESSIONS IN NEPHROTIC SENDROM, AS ONE
OF THE PODOCYTOPATHIES**

ALİZADA, Gunel

PhD in Biology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sabire KARAÇALI

Prof. Dr. Afig BERDELI

July 2013, 73 pages

Nephrotic syndrome (NS), is a chronic childhood disease which is characterized by the change of selective permeability of glomerular capillary and the loss of prevention role of protein leakage in the urine. In the management and follow up of childhood nephrotic syndrome, clinical response to treatment is important as much as pathological diagnosis. All pathological diagnostic types are classified as steroid sensitive, steroid dependent and steroid resistant according to response to steroid treatment. Progression to chronic renal failure is common in SRNSs and recurrence may be seen in the renal graft after transplantation. A new protein has been described in slit membrane of podocytes. The gene coding for this new protein is a calcium channel receptor named TRPC6. Mutations in TRCP6 are known to cause FSGS type 2.

In this study, TRCP6 gene mutation is investigated in nephrotic syndrome patients for the first time in Turkish population. Study population will includes 50 SRNS patients and 25 healthy controls. TRPC6 gene mutation screening is performed by direct DNA sequencing of all exons. We have not identified any mutations in our group of patient.

Keywords: Steroid Resistant Nephrotic Syndrome (SDNS), Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), Minimal lesion disease (MLH), TRPC6.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca sonsuz bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan tez danışmanım Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı başkanı sayın Prod.Dr.Sabire KARAÇALI ve büyük emeği için sayın Prof.Dr. Afig BERDELİ hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarımın ve doktora eğitimimin her aşamasında büyük bir özveri ile bana yardımcı ve destek olan sayın Doç.Dr. Cemal ÜN hocama teşekkürü bir borç bilirim. Teziminin tasarlanmasında ve düzenlenmesinde emeği olan Sn.Yard.Doç.Dr.Savaş İZZETOĞLU'na;

Doktora eğitimim sırasında bana daima destek olan Ege Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'daki sevgili arkadaşlarım Sn.Seçkin SOYA, Sn.Hüseyin ÖZAYDIN ve Sn.Atabak NAGHAVİ başta olmak üzere aynı zamanda Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi Moleküler Tıp Laboratuvar'ndaki tüm arkadaşlarıma;

Kendileri yanımda olmasalarda sevgileriyle her zaman yanımda olan, desteğini üzerimden hiç eksiltmeyen, bana her zaman güvenen ve her ne olursa olsun hep arkamda olan sevgili aileme, kolay olmayan bu yıllarda tüm acılı ve neşeli günlerimi paylaşan motivasyon kaynağı arkadaşlarım Lale MAMMADOVA, Cansel GÜÇLÜ, Ayten YUSİFOVA ve Leman EGEMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ.....	xix
KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
3. TANIM.....	6
3.1 Fizyolojik Protein Atılımı.....	9
3.2 Epidemiyoloji.....	12
3.3 Etiyoloji.....	12
3.4 Patogenez.....	13
3.4.1 Primer glomerüler hasarlanma.....	13
4. FOKAL SEGMENTAL GLOMERÜLOSKLEROZ (FSGS).....	14
4.1 FSGS Tip 1 (ACTN-4 geni)	15
4.2 FSGS Tip 2 (TRPC6 geni).....	15
4.3 FSGS Tip 3 (CD2AP)	16

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5. TRANSİENT RESEPTÖR POTANSİYEL (TRP) AİLESİ	17
6. TEDAVİ VE İZLEM	23
7. GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
7.1 Çalışma Grubu	23
7.2 Denatürpsyon ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	24
7.3 DNA Analizi (Sekanslama)	25
7.3.1 Otomatik DNA dizi analizi	26
8. METOD	29
8.1 DNA İzolasyonu	29
8.2 DNA'nın Kontrolü	30
8.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	31
8.4 PCR Ürünlerinin Purifikasyonu	33
8.5 DNA Dizileme	33
9. DEĞERLENDİRME	35
10. BULGULAR	37
10.1 DNA Sekans Analizi Bulguları	37
11. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	52
KAYNAKLAR DİZİNİ	61
ÖZGEÇMİŞ	71
EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. Glomerüler filtrasyon bariyeri	2
2. Podosit yapısı	5
3. Podosit üzerindeki yapılar.....	7
4. Podosit hasarında değişiklikler	10
5. TRPC6 Kromozomu.....	16
6. TRPC6'nın DAG İle Aktivasyonu.....	20
7. SD'de nefrin podosin ve TRPC6 ilişkisi.....	21
8. PCR sıcaklık döngüsü	25
9. TRPC6 nukleotid dizisi.....	34
10. 50 hastanın 3.eksonun Mega4 programı vasıtasıyla karşılaştırılması	35
11. 50 hastanın 1. Eksonun Mega 4 programı vastasıyla karşılaştırılması.....	36
12. 1.hastanın 1. Ve 2. Eksonlarının DNA sekans analizi elektroforegramı.....	40
13. 1.hastanın 2.2. Ve 3. Eksonlarının DNA sekans analizi elektroforegramı	40
14. 1.hastanın 4. Ve 5. Eksonlarının DNA sekans analizi elektroforegramı	41
15. 1.hastanın 6. Ve 7. Eksonlarının DNA sekans analizi elektroforegramı	41
16. 1.hastanın 8. Ve 9. Eksonlarının DNA sekans analizi elektroforegramı	42
17. 1.hastanın 10. Ve 11. Eksonlarının DNA sekans analizi elektroforegramı	42
18. 1.hastanın 12. Ve 13. Eksonlarının DNA sekans analizi elektroforegramı	43
19. 1.hastanın 3'UTR bölgesinin DNA sekans analizi elektroforegramı	43
20. 7. Hastanın Intron bölgesinde heterezigot nukleotid yerdeğişimi (c.171+20A>G).....	47
21. 9. Hastanın Intron bölgesinde homozigot nukleotid yerdeğişimi (c.171+20 A>G).....	47
22. 10.hastanın Intron bölgesinde heterezigot nukleotid yerdeğişimi (c.171+86 G>C).....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
23. 44. Hastanın Intron bölgesinde homozigot nukleotid yerdeğişimi (c.171+86 G>C).....	48
24. 47. Hastanın 11. eksonunda Phe843Phe843 polimorfizmi (TTC>TTT).....	49
25. 12. Hastanın 1.eksonunda Pro15Ser heterozigot polimorfizmi (CCC>TCC).....	49
26. 50. Hastanın 4. eksonunda A404V heterozigot polimorfizm (GCG>GTG). 50	
27. 10. Hastanın 6.eksonunda N561N heterozigot polimorfizm (AAT>AAC)... 50	
28. 14. Hastanın 3' UTR+552 T>G Heterozigot nukleotid değişimi.....	51

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1. Nefrotik sendromla ilgili genler ve yaptıkları hastalıkl	8
2. TRPC Kanalları İçin Önerilen Aktivasyon Mekanizmaları, İşlevleri Ve İlişkili Olduğu Hastalıklar	19
3. ABI Prism Big Dye™ terminatör reaksiyon kitinde ddNTP' lerin işaretlendikleri floresan boya isimleri ile bunlara karşılık gelen renkler.....	28
4. TRPC6 genin PCR'da kullanılan primer listesi	32
5. Hasta listesi	39

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DNA	Deoksiribonükleikacid
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
RNA	Ribonükleikacid
RT	Reverse Transkriptaz
Taq	Termo Stabil Polimeraz Enzimi
TBE	Tris Boric Asit EDTA
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenaz
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
NS	Nefrotik Sendrom
İNS	İdiyopatik Nefrotik Sendrom
MLH	Minimal Lezyon Hastalığı
FSGS	Fokal Segmental Glomerüloskleroz
MPGN	Membranoproliferative Glomerulonefrit
MGN	Membranöz Glomerulonefrit
SDNS	Steroid Dirençli Nefrotik Sendrom
SYNS	Steroide Yanıtlı Nefrotik Sendrom
GBM	Glomerüler Bazal Membran
SD	Slit Diafram
NPHS1	Nefrin
NPHS2	Podosin
PLCE1	Fosfolipaz C Epsilon 1
WT1	Wilms Tumor Geni
ACTN4	Alfa-Aktinin-4
TRPC6	Transient Receptor Potential Cation 6

KISALTMALAR (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CD2AP	CD2-Assosiye Protein
CASK	Calcium / Calmodulin- Dependent Serine
PKC	Protein Kinase C
MA	Moleküler Ağırlık
GKD	Glomerüler Kapiller Duvar
SBNS	Steroide Bağımlı Nefrotik Sendrom
SANS	Sık Atak Nefrotik Sendrom
KNS	Konjenital Nefrotik Sendrom
EM	Elektron Mikroskobu
IgM	İmmün Globulin
ISKDC	Çocuk Böbrek Hastalıkları Çalışma Grubu
OD	Otozomal Dominant
OR	Otozomal Resesif
DDS	Denys-Drash Sendrom
DMS	Diffüz Mezangial Sklerozis
mRNA	Messenger RNA
EtBr	Etidyum Bromür
Ct	Threshold Cycle
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleikasit
rRNA	Ribozomal Ribonükleikasit
ATP	Adenozin Trifosfat
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
CTP	Citosine- triphosphate
UTP	Urasil-triphosphate
DAG1	Dystrophin-Associated Glycoprotein 1
GLEPP-1	Glomerular Epithelial Protein 1

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Nefrotik sendrom (NS), glomerüler kapiller duvarın seçici geçirgenliğinin değişmesi ve idrarda protein kaçışını önleyici rolünü kaybetmesi ile karakterize olan çocukluk çağının kronik hastalığıdır. Ağır proteinüri, Hipoalbuminemi, Ödem, Hiperlipidemi ile izlenmektedir. Nefrit bulgularının veya böbrek dışı hastalığın eşlik etmediği, nedeni belli olmayan (idiyopatik) nefrotik sendromun en sık görülen şeklidir. Çocukluk yaş grubu nefrotik sendromların %85'ini idiyopatik NS (İNS) oluşturmaktadır (Özçakar vd., 2004).

Başlıca primer idiyopatik nefrotik sendrom tipleri;

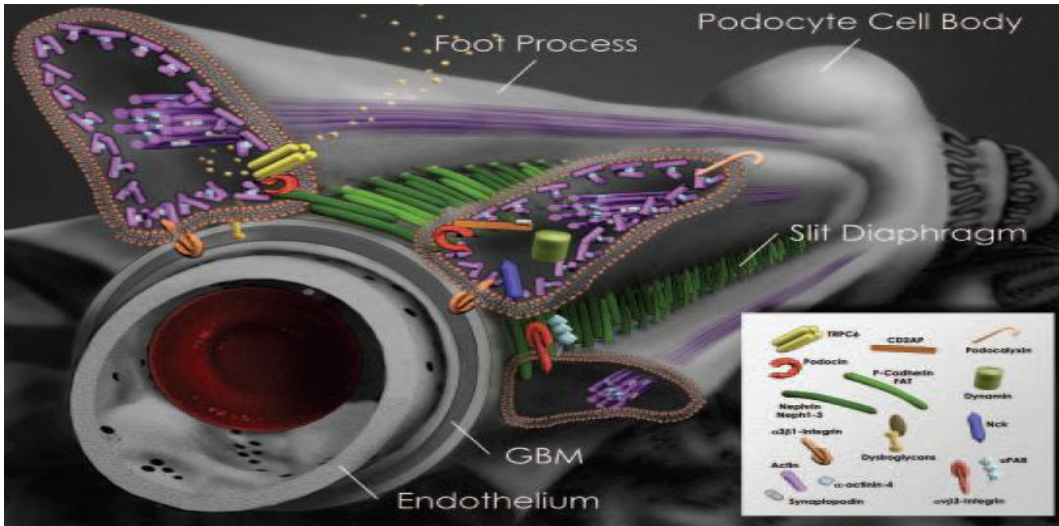
1. Fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS),
2. Minimal lezyon hastalığı (MLH),
3. Membranöz glomerulonefrit (MGN)
4. Membranoproliferative glomerulonefrit (MPGN),

Histolojik olarak istatistik değerlendirilmelere göre hastaların %77'sinde MLH, %23'ünde ise FSGS, MPGN, MGN gibi diğer böbrek patolojileri görülmektedir (ISKDC, 1981).

İNS'un sınıflandırılmasında steroid tedavisine verilen yanıtı göre steroide yanıtı NS (SYNS) ve steroid dirençli NS (SDNS) olmak üzere iki gruba ayrılır. Günümüzde, yapılan istatistik hesaplamalar göre İNS'lu çocukların %27'si SDNS olarak tanımlanmaktadır.

Hastalığın histolojik özellikleri coğrafik ve etnik köken ile değişiklik gösterir. SDNS'un arkasında farklı histomorfolojik değişiklikler olsa da en baskın histoloji FSGS'dur. FSGS, çocukluk çağı nefrotik sendromları arasında önemi giderek artan ve prognozunun kötülüğü nedeniyle kronik böbrek yetmezliği nedenleri arasında öne çıkmakta olan bir patolojidir.

Hastalığın merkezinde birincil sorun masif proteinürinin ortaya çıkmasıdır. Proteinüri hem klinik prognostik faktör olarak hem de progresiv renal fonksiyon kaybını öngörebilme açısından oldukça önemlidir. Proteinürinin patogenezinde primer glomerüler hata, dolaşımdaki permeabilite faktörleri-inhibitörleri ve olası immünolojik mekanizmalar sorumlu tutulmuştur. Glomerüler hastalıkların çoğunluğunda da bu glomerüler kapiller duvarın seçici geçirgen özelliğindeki değişiklikler ile glomerüler filtrasyon bariyerini oluşturan yapılardaki anormallikler sonucu meydana gelmektedir. Glomerüler filtrasyon bariyeri, üzerinde çok sayıda porlar bulunan kapiller endotel hücreleri, bunu dışardan destekleyen glomerüler bazal membran (GBM) ve visseral epitel hücrelerinden (podosit) oluşur (Şekil 1). Bu bariyerin en aktif bileşeni podositler arası hücre hücre ilişkisini sağlayan slit membrandır (SD) (Kawachi, H., vd., 2006). SD üzerinde (nefrin, podosin, NEPH, FAT, ZO-1, P-cadherin), podosit ile GBM arasında (alfa-aktinin 4, laminin), podosit hücre sinyal iletiminde (CD2AP, aktinin vb) ve podosit kontraktilesinde görev alan pek çok protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerin yapısında ya da birbiri ile olan ilişkilerindeki bozukluk podosit ayakları çıkıntılarında silinmeye neden olarak proteinüriye sebep olmaktadır (Özçakar vd., 2004).



Şekil 1 : Glomerüler filtrasyon bariyeri (GFB)

(Möller C. C., 2009)

Glomerular filtrasyon bariyerini oluşturan proteinlerde oluşan ve yapısal değişikliklere sebep olan genetik nedenler son yıllarda pozisyonel klonlama yaklaşımlarıyla tanımlanmaya başlanmıştır.

GFB'deki proteinlerin ekspresyon farklılıklarının tanımlanması glomeruler hastalıklarının bir kısmının patofizyolojisinin anlaşılmasına büyük katkı sağlanmıştır. Bugüne kadar tanımlanmış genetik defektleri derlersek tamamı gen transkripsiyonu, slit diafram, aktin temelli hücre iskeleti ve adezyon kompleksleri dahil kritik podosit fonksiyonel yapılarının normal işleyişini ve düzenini etkiler (Kitano, Y., Yoshikawa, N. ve Nakamura, H., 1993).

Steroid dirençli nefrotik sendromda proteinüri oluşumuna yol ačan molekuler mekanizmanın araştırılarak, hastaların tedavi seğiminde, bu tedaviye yanıtın önceden tahmin edilebilmesinde, izlemede gelişebilecek son dönem böbrek yetmezliğini ve böbrek transplantasyon kararında yol gösterici bir kriter olarak kullanılması gerekmektedir. Sonuç olarak tedavide remisyonu sağlamak kadar tekrarların en aza indirilmesi de önemlidir ve tedavi bu durum göz önüne alınarak planlanmalıdır. (Zenker, M.,2009)

Elde edilecek sonuçlar, literatür verileri ile beraber ilerde artacak hasta sayıları ile heterojen bir klinik gösteren bu hasta grubunda tedavi ve prognoz hakkında önceden bilgi edinme fırsatı sağlayacak ve yöntemini kolaylaştıran protokoller oluşmasına katkıda bulunacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

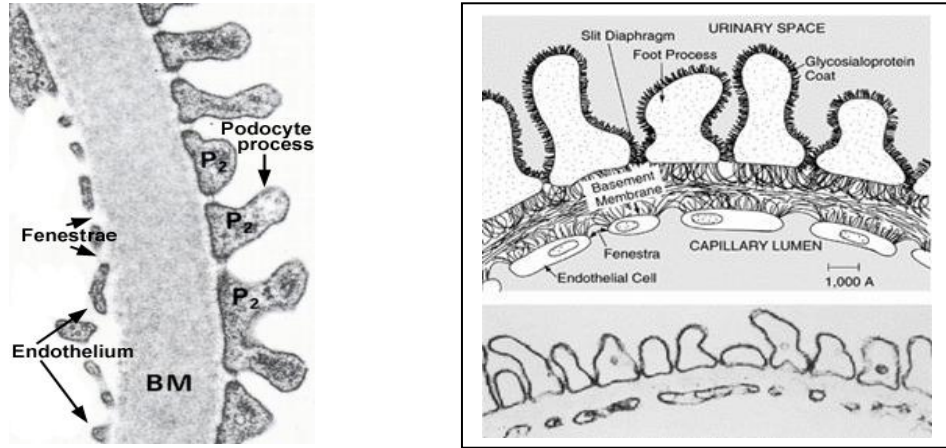
Nefrotik Sendrom, ilk kez 15. yüzyılda bildirilmiştir (Eddy ve Symons, 2003). Ödem ve proteinüri birlikteliği uzun zamandır bilinmesine karşın, ancak 1827'de Richard Bright, bu bozukluğun böbreğe bağlı olarak ortaya çıkabileceğini bildirmiş ve hastalık uzun süre onun adıyla anılmıştır. Sonrasında Volhard ve Fahr bilateral böbrek hastalığını sınıflandıran nefrosis terimini kullanmışlardır (ISKDC, 1981).

Böbrek önemli endokrin organ olarak Renin, eritropoetin, 1-25 dihidroksikole kalsiferol, prostaglandin ve kinin salgılar. Birçok hormon için de (steroidler, antidüretik hormon, vs) hedef organı görevi yapar. Böbrek düşük ağırlıklı proteinleri katabolize ederek; amonyogenez ve glikoneogenez gibi bazı metabolik fonksiyonlara ev sahipliği yapar.

Glomerulun yapısı üç ana hücre tipi (epitel, mezanşial ve endotelial hücreler) ve ekstrasellüler olarak da, filtrasyon fonksiyonu olan iki ekstrasellüler bölgeden (glomerül bazal membran ve mezengial matriks) oluşmaktadır.

Glomerüller bazal membran kollajen ve glikoprotein elemanlarından oluşmaktadır. Glikoproteinler sialik asit içerirler. Glomerüller bazal membranın 50°A büyüklüğünde moleküllere geçirgen olduğu halde, 36°A büyüklüğündeki albumini geçirmemesi bazal membranın geçirgenliğinde elektriksel yüke göre seçici olan rolünü göstermektedir. Glomerüller endotel hücreleri, sialik asit tabakası ve bazal membran, negatif yüklü (anyon) yüklüdür (Anthea et al., 1993).

Podosit olarak da adlandırılan glomerüller visseral epitelyal hücreler, glomerüller bazal membranın dış yüzünü kaplayan oldukça özelleşmiş hücrelerdir. Proteinüri ile seyreden bütün nefrotik sendromlarda podositlerde hasar vardır (Camici, 2007). Podositler ayakçıklıklarla bazal membrana dayanırlar, bunlar özellikle albumini itici olan negatif yüklüdür (Candiano, 2001). Podositler ve podositler aralarındaki slit diaframın negatif yükü, salgıladıkları protein gibi maddelerle (podosin, nefrin, alfa-actinin, kadherin FAT, CD2AP vs) sağlanır.



Şekil 2. Podosit yapısı

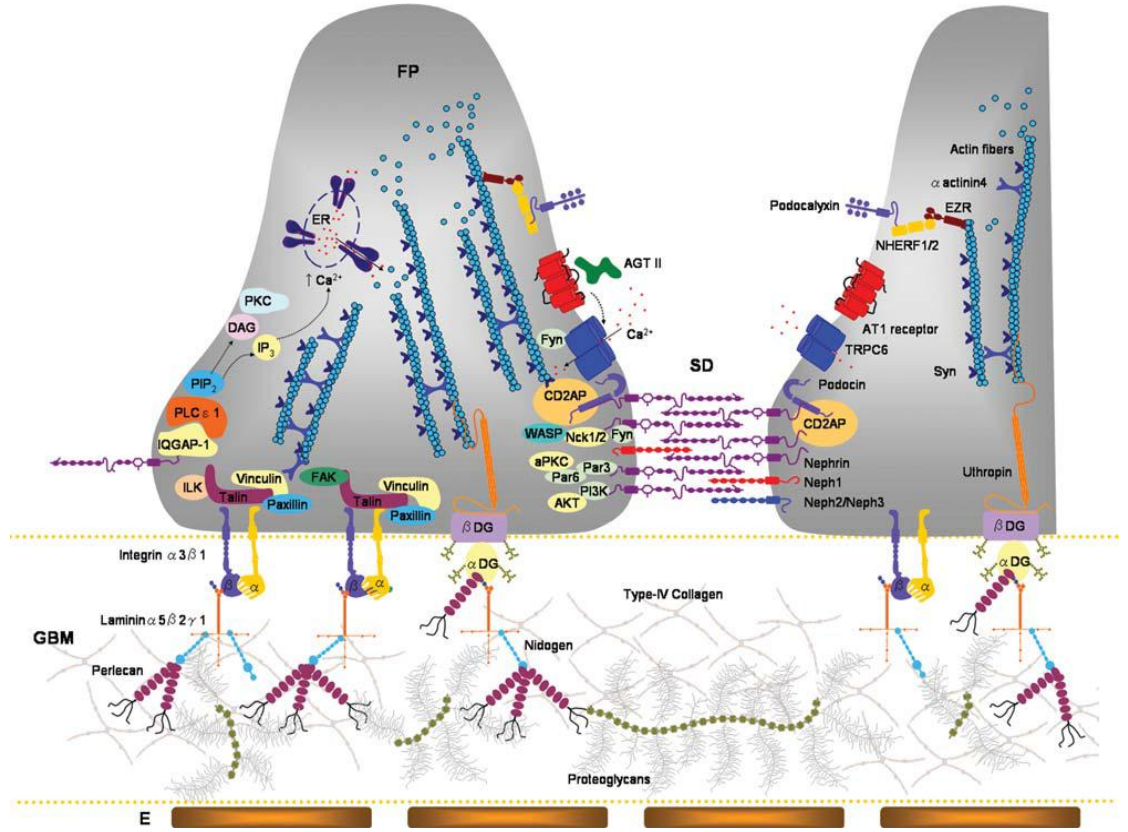
Podosit ayaklı çıkıntıları arasındaki slit diafram, filtrasyon bariyerinin son noktasıdır. Protein filtrasyon bariyeri 30-40 nm genişliğinde bir membrandır ve filtrasyon yarığını meydana getirir, ayrıca podosit ayaklı çıkıntılarının birbiriyle ilişkilerini sağlar (Şekil 2). Proteinürinin başlıca nedeni olan podosit hasarına genetik mutasyon dışında immünolojik etkenler, viral enfeksiyon ve glomerüldeki anormal hemodinamik değişiklikler yol açabilmektedir. Podosit sayısı yaşla beraber ve toksinlerle azalma göstermekte glomerülosklerozda ve IgA nefropatisinde azalmakta ve hastalığın ilerleyeceğinin bir ön tahmini ölçüsü olarak gösterilmektedir (Camici, 2007; Kawachi et al., 2006).

3. TANIM

Nefrotik sendrom glomerüler kapiller duvarın seçici geçirgenliğinin değişmesi sonucunda idrarda protein kaçağını önleme yeteneğini kaybetmesi ile karakterize olunan ödem ve hipoalbuminemi (<2.5 g/dl) eşlik ettiği çocukluk çağının kronik hastalığıdır (Eddy and Symons, 2003; Gbadegesin and Smoyer, 2008).

Podositlerin proteinüride çok önemli rolleri vardır. Hücre gövdesi, ana çıkıntılar ve ayaklı çıkıntılar olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır. Ayaklı çıkıntıları GBM ile direkt ilişkilidir. Komşu hücrelerin ayaklı çıkıntıları ile birlikte filtrasyon yarıklarını oluştururlar. Bu yarıklar diyafram ile bağlanırlar. Podosit gen değişimleri (nefrin, podosin, a-actinin) yanı sıra podosit membran antijenlerine karşı oluşan antikorlar (MN), hemodinamik etkilenme (diyabet), toksinler (steroid dışı antiinflamatuvar ilaçlar), infeksiyonlar (insan immün yetmezlik virüsü) podositlerde hasar oluşturabilmektedir. Böbrek hasarı ne olursa olsun eğer podosit kaybı varsa glomerüloskleroz ile sonuçlanmaktadır (Mundel and Shankland, 2002).

Glomerüler filtrasyon bariyerini oluşturan proteinlerin yapısal anormalliklerine neden olan genetik nedenler son 10 yıl tanımlanmaya başlanmıştır. Bugüne kadar tanımlanmış genetik defektlerin tamamı gen transkripsiyonu yada slit membran, aktin temelli hücre iskeleti ve adezyon kompleksleri dahil kritik podosit fonksiyonel yapılarının normal işleyişini ve düzenini etkiler. Bu genler içerisinde resesif nefrin (NPHS1), podosin (NPHS2), fosfolipaz C epsilon 1 (PLCE1), dominant Wilms tumor geni (WT1), alfa-aktinin-4 (ACTN4), 'transient receptor potential cation 6 (TRPC6), CD2-assosiyasyon protein (CD2AP) bulunmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3: Podosit üzerindeki yapılar

(Machuca E., 2009)

Nefrotik sendrom ve Proteinüri ile ilişkili podosit proteinlerini (nefrin, podosin, a-actinin gibi) kodlayan genlerdeki değişimlerin saptanması ile glomerül filtrasyon bariyerinin kapsamı ve podositlerle ilgili daha fazla bilgi elde edilmiştir. Bu gen değişimlerinin bazı doğumsal ve ailevi NS'lerden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Tablo 1) (Eddy and Symons, 2003; Pollak, 2003; Khoshnoodi and Tryggvason, 2001). Glomerüler podositlerin zarar görmesi glomerüler filtrasyon bariyerlerin değişmesiyle sonuçlanır ve ultrafiltrasyondan protein kaçağı gerçekleşir. SD'deki proteinlerin yapısal bozukluğu (nefrin, podosin, CD2AP), podosit ve GBM ilişkisinin bozukluğu, podositin negatif elektriksel yükün değişmesi, proteinüriye yol açabilir (McBryde et al., 2001).

Tablo 1: Nefrotik sendromla ilişkili genler ve yaptıkları hastalıklar

Gen	Protein	Bölge	KalıtLtti	Hastalık
NPHS1	Nephrin	19q13.1	Otozomal Resesif	Fin Tipi Konj enital NS
NPHS2	Podosin	1q25-32	Otozomal Resesif	Steroide Dirençli NS
ACTN4	a-actinin-4	19q13	Otozomal Dominant	FSGS1
TRPC6	'transient receptor potential cation 6	11q21-22	Otozomal Dominant	FSGS2
WT1	Wilms tumoru-	11p13	Otozomal Dominant	Wilms tumoru
CD2AP	CD2-associated protein	6p12	Otozomal Dominant	FSGS3

Nefrotik düzeyde proteinüri hastalığı tanımlamada önemli yer tutar. Günlük protein atılımının 40 mg/m /saat ya da 50 mg/kg'ın ya da spot idrar proteinin idrar kreatinine oranının 2mg/mg üzerinde olması nefrotik proteinüri olarak tanımlanmıştır (Gbadegesin and Smoyer, 2008).

3.1 Fizyolojik Protein Atılımı

Plazma proteinlerinin 1/3'ü albumin, diğerleri ise, globulinler oluşturur. Molekül ağırlığı (MA) 40 kDa'dan küçük olan plazma proteinleri glomerüler bazal membrandan direkt geçtikten sonra proksimal tübüler hücreleri tarafından geri emilir (Candiano, 2001). Moleküler ağırlığı 69 kDa olan albumin çok düşük miktarlarda filtre edilir.

Glomerüler kapiller duvar (GKD) yüksek ultrafiltrasyon kapasitesine sahip bir membrandır ve bu bariyerden protein geçişinin engellenmesi ancak kısmen anlaşılabilmiştir. Membran küçük solütlere aynı zamanda suya oldukça geçirgendir ancak daha büyük moleküllerin geçişine karşı önemli bir engel oluşturur. Glomerüler kapiller duvar; vasküler endotelial hücreler, glomerüler bazal membran (GBM), epiteliyal hücreler (podosit) ve bu podosit hücreleri arasındaki slit diyaframdan (SD) oluşur (Kim et al., 2005). Bu katmanlardan moleküllerin geçişi büyüklüklerine, yüklerine ve konfigürasyonlarına göre değişiklik göstermektedir. Makromoleküllerin glomerüler kapiller duvardan (GKD) filtre olması glomerüler bariyerin büyüklük seçici ve yük seçici özelliklerine göre belirlenmektedir (Hodson et al. , 2004).

Herhangi bir molekülün glomerüler kapiller duvardan filtre olunması molekülün büyüklüğü ile ters orantılıdır. Endotel hücrelerinin büyüklük seçici bariyere katkısı yoktur. Endotel hücrelerinin arasında bulunan pencereler kanın şekilli elemanlarının geçişini engeller ancak makromoleküllerin filtrasyonuna engel olamazlar.

Endotel açıklıklardan plazma proteinleri kolaylıkla geçerek bir direnç ile karşılaşmadan GBM'a ulaşır. Özellikle küçük molekül ağırlıklı proteinler, GBM boyunca ekstraselüler olarak geçerek SD'a ulaşır. Büyük molekül ağırlıklı proteinlerin geçişini sınırlayan GBM, fibrillerden oluşan bir ağ şeklindedir ve iç içe geçen fibriller, ufak delikli bir filtre işlevi gören fonksiyonel porlar içermektedir. GBM büyüklük seçici bariyerin majör kısmını oluşturmasına karşın, son yıllarda yapılan çalışmalar podositlerin ayaklı çıkıntılarının (foot processes) arasını kapatan ve slit diyafram (SD) adı verilen ince bir membran üzerinde yoğunlaşmaktadır. Podositler, glomerüler filtrasyon bariyerinin en dış kısmını oluştururarak, glomerüler kapilleri tarak dişleri şeklinde sarar. Her bir tarak dişini, birbirine komşu podositlerin ayaklı çıkıntıları oluşturur. GBM ile ilişkili podosit ayaklı çıkıntılar statik olmayıp, kontraktif bir sistem içerir. SD, ayaklı çıkıntıların birbiri ile ilişkisini sağlar. Filtrasyon delikleri içeren bir köprü olan SD, GBM ile yakın ilişkili bir membrandır ve glomerül filtrasyon bariyerinin biyolojik aktif bileşenidir. Günümüzde SD'nin moleküler yapısı ve fonksiyonu ile ilgili çalışmalar sürmektedir.



Şekil 4. Podosit hasarında değişiklikler

(Matovinović M., 2009)

SD'da varlığı gösterilen proteinlere her gün bir yenisini eklenmektedir (nefrin, CD2AP, podosin, Nephl) (McBryde et al., 2001). GBM'nin temel yapısını kollagen tip IV, nidogen, laminin, heparan sülfat proteoglikanlar (Şekil 4) oluşturur (ISKDC, 1981). Endotelial hücreler ve GBM, yapılarında bulunan heparan sülfat proteoglikanları nedeniyle negatif yük taşırlar. Podositler ve ayaklı çıkıntılarının yüzeyleri de negatif yüklü sialoproteinlerle kaplıdır. Bu yapılar, nedeniyle güçlü negatif elektrik yükü taşıyan ayaklı çıkıntılarının birbirine yapışması da engellenmiş olur. Dolaşımdaki makromoleküllerin büyük kısmı fizyolojik pH'da anyonik özellik taşıdıklarından, albumin gibi büyük anyonların geçişi bu şekilde engellenir (McBryde et al., 2001). 40 kDa'nın altında olan ve serbestçe filtre olan proteinler özellikle proksimal tübülde reabsorbe sonra da katabolize edilmektedirler. Düşük molekül ağırlıklı proteinler, peptidler, hormonlar (insülin gibi), Ig parçacıkları (hafif zincir, -2 mikroglobulin) ve çeşitli enzimler (lizozim, amilaz gibi) primer olarak böbrekte katabolize edilir. Bu proteinler, tübüllerin reabsorpsiyon ve metabolize etme kapasitesini aşacak şekilde filtre olursa idrarda saptanabilirler (Eddy and Symons, 2003; Habashy et al., 2003).

Podositlerdeki moleküller 4 temel bozukluk, proteinüriye yol açabilir;

1. SD'deki proteinlerin yapısal bozukluğu (nefrin, podosin, CD2AP gibi),
2. Podosit ve GBM ilişkisinin bozukluğu (podosin-GBM adezyonu),
3. Podosit-actin (hücre iskeleti) ve etkili proteini p actinin 4 bozukluğu,
4. Podositin apikal yüzündeki negatif elektriksel yükün değişmesidir.

Hastalığın erken evresinde benzer histopatolojik değişiklikler gözlemlendiği için İNS'un sınıflanmasında steroid tedavisine verilen yanıtı göre yapılan sınıflama klinik pratikte daha kabul görmüştür. Buna göre İNS'lu hastalar, steroid yanıtı NS (SYNS) ve steroide dirençli NS (SDNS) olarak iki ana kategoride değerlendirilmişlerdir (Hodson et al., 2004; Kim et al., 2005). SDNS yaklaşık %10 oranında bildirilse de (McBryde et al., 2001; ISKDC, 1981) günümüzde, İNS'lu çocukların %27'si SDNS olarak tanımlanmaktadır (Kim et al., 2005).

Steroid tedavisine olan yanıtı göre, hastanın klinik durumunu değerlendirmede bazı tanımlamalar yapılmıştır (Gbadegesin and Smoyer, 2008).

Steroide Dirençli NS (SDNS): İki farklı şekilde tanımlama yapılmaktadır.

Society of French Speaking Pediatric Nephrologists'e göre (Niaudet, 1994): Dört haftalık 60 mg/m²/gün (2 mg/kg/gün) prednizolon tedavisi ve ardından 3 kez intravenöz pulse metilprednisolon tedavisine rağmen remisyon sağlanmaması.

Steroid Yanıtlı NS (SYNS): Dört hafta boyunca 60 mg/m²/gün prednizolon tedavisi ile idrar proteininin ardışık 3 gün ya da 1 hafta içinde bakılan 3 ayrı idrar tetkikinde < 4 mg/m²/saat olması veya dipstik ile 0 veya eser olması.

3.2 Epidemiyoloji

İdiopatik NS'un insidansı 100.000 çocukta 2-2.7 olgu, prevalansı ise 100.000 çocukta 12-16 olgu olarak bildirilmiştir (Eddy and Symons, 2003). Hastalığın görülmesinde küçük çocuklarda erkek cinsiyet oranı (erkek/kız: 2/1) daha yüksek olarak gözlenirse de ergen ve erişkin yaş gruplarında kız ve erkeklerde hastalık eşit oranda bildirilmektedir. Özellikle son yıllarda yapılan böbrek biyopsi araştırmalarında FSGS olgularının arttığı gözlenmiştir. İngiltere'de yaşayan Asya kökenli çocuklarda İNS, Avrupa kökenli çocuklara göre 6 kat daha fazla bulunmuştur (Sharples et al., 1985). Buna karşın Afrikalı çocuklarda ise İNS insidansı düşük bulunmuştur (Abdurrahman et al., 1990). Bonilla- Felix M ve ark. (Bonilla et al., 1999) çalışmasında, FSGS, Amerika'da yaşayan hastalarda; İspanyollarda Kafkaslarda %18 ve Afrikalı Amerikalılarda % 47 oranında bildirilmiş ve histopatoloji üzerinde ırk ile ilişkili faktörlerin önemi vurgulanmıştır. Hastalığa en sık 2 yaşında rastlanırken, olguların %70-80'i 6 yaşından önce başvurmuştur (Arneil, 1971).

3.3 Etiyoloji

Çocukluk yaş grubu NS'un büyük çoğunluğunu İNS oluşturmaktadır. FSGS; idiyopatik ve sekonder olabilir. Ayrıca FSGS'nin ailesel ve sporadik formu tanımlanmıştır. Ailesel formu farklı fenotipik ve genotipik özellikler taşır.

FSGS'de olguların çoğu idiyopatik olmakla birlikte MLH'dan progresyon en önemli neden olarak görülmekte ve bazı araştırmacılara göre aynı klinik patolojinin farklı spektrumlarını temsil etmektedirler. Yaşamın ilk 3 ayında görülen NS, konjenital NS (KNS) olarak adlandırılır ve çoğunlukla genetik kökenlidir, 3-12 ayda gözlenen NS'da da %40 genetik nedenler söz konusudur (Arneil, 1971; Bustin and Dorudi, 1998). İdiyopatik NS yaşamın 1. yılından itibaren artarken sekonder NS olgularına da 10 yaş sonrasında rastlanır.

3.4 Patogenez

Tüm nefrotik sendromlu hastalarda merkez anormallik masif proteinürinin ortaya çıkmasıdır. Podositlerin kopması ve alttaki bazal membrandan ayrılmasıyla oluşan genişleme erken bir ultrastrüktürel lezyondur.

Patogenezde rol oynayan etkenler dört ana grupta ele alınmaktadır:

1. Hemodinamik etkenler
2. Humoral etkenler
3. Genetik predispozisyon
4. Podosit zedelenmesi

Podositlerdeki füzyon, adezyon ve kopmalar, Bowman kapsülü ve pariyetal epiteliyal hücreler arasında sineşilere yol açar. Sonuçta oluşan bu segmental skleroz global sklerozise doğru ilerlemektedir (Kalman, 2004).

3.4.1 Primer glomerüler hasarlanma

Böbreğin birincil asıl görevi kanı glomerüllerden filtre ederek sıvı ve artık ürünlerin atılımını sağlarken kan proteinlerinin büyük bölümünü ve kan hücrelerini dolaşıma geri vermektir. Bu filtrasyon görevi glomerüler filtrasyon bariyeri ile gerçekleştirilir (Gbadegesin and Smoyer, 2008). Slit diyafram (SD) olarak bilinen özelleşmiş hücre-hücre bağlantıları ile ilişki içindedir. Ayrıca negatif yüklü heparin sülfat proteoglikandan oluşan GBM, negatif yüklü molekülleri pasajdan aynı büyüklükteki pozitif yüklü moleküllere göre sınırlandırıp uzak tutar. Nefrotik sendrom, GBM'nin negatif yükünde kayıp

oluşması sonucunda ortaya çıkar (Kitano et al., 1993). Bunun yanında 42A çapından ya da 200 kDA'dan büyük olan moleküller filtrasyon bariyerini geçemezler. Filtrasyon bariyerindeki bu sınırlandırma podosit ayakları çıkıntılarının ve SD'nin bütünlüğüne ve GBM'nın elektriksel yüküne bağlıdır (Gbadegesin and Smoyer, 2008). İlk defa 1974'de, Rodewald ve Karnovsky, elektron mikroskopunda (EM) tavşan ve sıçan böbreklerinde, SD'nin moleküler yapısını ve kompozisyonunu göstermişlerdir (Rodewald and Karnovsky, 1974). Fermuar modeline benzetilen SD; podosit ayakları çıkıntılar arasında uzanan 11nm kalınlıkta fibrillerdir. Bu fibriller orta noktada hiç boşluk bırakmadan birleşirken; kenar bölgelerde $4 > 14$ nm filtrasyon porları oluşturmaktadır. SD; böbrekteki en önemli büyüklük selektif filtrasyon bariyeri olarak kabul edilmektedir. Bundan dolayı günümüzde SD'nin moleküler yapısı ve fonksiyonu üzerinde çalışmalar yapılmakta ve yeni proteinler tanımlanmaktadır. Podosit ve SD yapısında rol alan proteinlerde fonksiyon kaybı sonucu ortaya çıkan podosit ayakları çıkıntılarında birleşme veya silinme esas bozukluktur.

4. FOKAL SEGMENTAL GLOMERÜLOSKLEROZ (FSGS)

Fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS), çeşitli nedenlere bağlı olarak gelişen glomerül hasarının ortak histolojik bir bulgusudur. Hastalığın erken dönemlerinde sadece bir kısım glomerül segmental olarak etkilenirken, diğer glomerüller normaldir. Hastalık ilerledikçe diffüz ve global glomerüloskleroz gelişmektedir.

Birbirinden farklı birçok mekanizma ile ortaya çıkabilen FSGS seyrinde lezyonların bazı glomerüllerin bazı segmentlerde görüldüğü asemptomatik proteinüriden NS'ye kadar birçok klinik tabloya yol açabilen bir sendromdur. FSGS her yaşta görülebilmekle beraber siyah ırkta en sık NS yapan hastalıktır. 1957 yılında Arnol Rich garip histoloji bulguları olan çocuk izlemlemiştir. Bu çocukların böbrek biyopsilerinde bazı glomerüllerde segmental progresif fibrozis saptamıştır. İlerleyen yıllarda bu FSGS olarak adlandırılmıştır.

Kalıtsal, geç başlangıçlı FSGS genellikle OD geçiş gösteren heterojen bir gruptur. Etkilenen aile bireylerinde 3 tane hastalık yapıcı lokus tanımlanmıştır: bunlar sırasıyla ACTN4, TRPC6 ve CD2AP olup; FSGS1, FSGS2 ve FSGS3'e neden olurlar

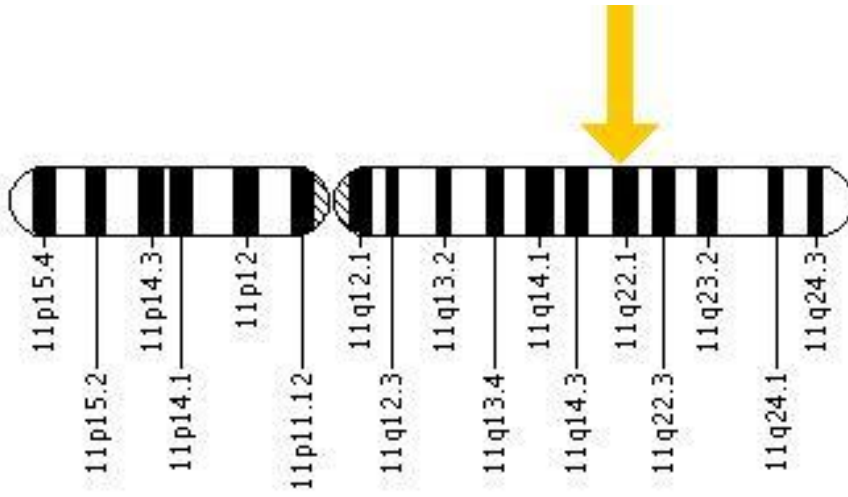
4.1 FSGS Tip 1 (ACTN-4 geni)

İlk kez 1998'de OD geçiş gösteren geç başlangıçlı FSGS 19. Kromozomda bir lokusda (19q13) yer alan ACTN-4 geninde tanımlanmıştır (Weber, 2008 ; Kaplan et al., 2000). ACTN-4 geni (OMIM 604638) hücre motilitesinde podosit hücre bütünlüğünü sağlayan aktin paketlenmesinde önemli göreve sahip olan α -actinin-4'ü kodlar. Aynı zamanda ACTN4 podositlerin ayaksı çıkıntılarının oluşumunda rol oynamaktadır. Alfa aktinin-4 podositlerde yüksek oranda eksprese olup ayaksı çıkıntılarda F-aktin filamanlarıyla çapraz bağ oluşturur. Hastalığa neden olan mutasyonlar α -actinin-4'ün F aktine olan ilgisini arttıracığından glomerüler podositlerdeki aktin filamanlarının normal düzenini bozarak glomerüler seçici geçirgenliği etkiler. Kaplan ve ark. (Kaplan et al.,2000) 3 farklı ailenin bireylerinde ACTN-4 mutasyonlarını tanımlamışlardır. Bu hastalarda ergen dönemde hızla başlayan proteinüri ve erişkin dönemde FSGS ile böbrek yetmezliği saptanmıştır. Ancak günümüzde kalıtsal FSGS'ler arasında sadece %4'ü FSGS Tip 1 ile karşılaşılmaktadır (Weins et al., 2005).

4.2 FSGS Tip 2 (TRPC6 geni)

1999'da, OD geçiş gösteren geç başlangıçlı FSGS tip 2 için 11. kromozomda 1q21-q22 yerleşimli bir lokusun varlığından söz edildi (Şekil-5). Bundan 6 sene sonra 2005'de sorumlu gen TRPC6 (transient receptor potential cation channel) tanımlandı (Weber, 2008; Reiser et al., 2007). İstatistiki araştırmalar sonucu belli olmuştur ki FSGS Nefrotik Sendromlu hastaların %23'ünü oluşturur. TRPC6, G protein ile ilişkili reseptörler ile reseptör tirozin kinazların aktivasyonundan sonra hücre için kalsiyum konantrasyon artışını sağlayan bir kalsiyum kanalıdır. Podositte SD'a yakın yerleşimli olduğu gösterildi. TRPC6 podosit slit por ile ilişkili olup muhtemelen "slit diafram" sinyal olaylarına katılmaktadır. Erişkin bireylerde gösterilen bu mutasyonun erken başlangıçlı

SDNS'da rol oynadığı bildirildi. Ancak, bir katyon kanalının disfonksiyonun podosit gelişimi ve glomerüler filtrasyon bariyer fonksiyon kaybına nasıl yol açtığı halen tam olarak açıklık kazanmamıştır. TRPC6 gen mutasyonunun SD'da nefrin ve podosinle olan ilişkisinden yola çıkarak intrasellüler ve interselüler ilişkilerde SD'da podosin ve nefrinin dolaylı olarak fonksiyonunu bozduğu düşünülmektedir. TRPC6 gen mutasyonlarının, podosit hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu etkilediği düşünüldü (Weber, 2008).



Şekil 5: TRPC6 Kromozomu

4.3 FSGS tip 3 (CD2AP)

1999'da, OD geçiş gösteren geç başlangıçlı FSGS tip 3'e neden olan CD2AP geni 6p12 yerleşiminde gösterildi. (Pollak, M.R., 2003)

5.TRANSİENT RESEPTÖR POTANSİYEL (TRP) AİLESİ

1986 yılında ilk defa meyve sineği *Drosophila melanogaster* görme sisteminde varlığı gösterilen “Transient receptor potential, TRP” iyon kanal proteinlerinin yeni bir kalsiyum homeostaz mekanizması gündeme gelmiştir. *D.melanogaster*'deki fotoreseptör protein rodopsinin ışık ile aktivasyonu G-proteini aracılığı ile, IP3 oluşumuna ve sonuçta sürekli bir membran depolarizasyonuna neden olmaktadır. Depolarizasyon, iki farklı kondüktanstan biri kalsiyuma, diğeri sodyum ve kalsiyumun ikisine birden geçirgen kaynaklanmaktadır. Bu yollar hücreye Ca^{+2} girişi Ca^{+2} - bağımlı ışık adaptasyonu yönünden önemlidir. Sonuç olarak biyolojik mekanizmalara ilişkin birbirinden bağımsız yapılan çok sayıdaki çalışma TRP süperailesinin varlığını ortaya çıkarmıştır. (Clapham, D . E., Runnels, L. W., Strubing, C. 2001)

Önceleri uyarılmayan hücrelerin kalsiyum homeostazında işlevsel olduğu düşünülen bazı TRP kanal proteinlerinin aracılık ettiği Ca^{+2} girişi “store-operated calcium entry, SOCE”nin uyarılabilen hücreler için de kritik olduğu bulunmuştur. SOCE’de işlev gören TRP’ler hücre içi Ca^{+2} depolarının boşalması ile uyarılmaktadır. Bu da hücrenin dış uyarıların yanı sıra içsel gereksinimler doğrultusunda da membran iyon geçirgenliğini değiştirebileceği olgusunu ortaya koymuştur. TRP kanallarının birçok fizyolojik olayda hücrel algılayıcılar olarak önemli işlevleri olduğu önerilmektedir. TRP kanallarının çevresel uyarılardaki değişiklikleri ayrımsal olarak belirleyen evrensel biyolojik sensörler oldukları düşünülmektedir. TRP kanallar ile çalışmanın en büyük zorluğu ise farmakolojik modülatörlerinin bulunmamasıdır. Multimerik iyon kanalını oluşturan üyelerin dokuya veya strese bağlı olarak değişim göstermesi TRP araştırmalarını daha da karmaşık duruma getirmektedir. TRPC proteinlerinin aktivasyon mekanizması ve fizyolojik işlevi tam olarak bilinmemektedir.

TRP ailesini amino asid benzerliklerine göre 7 alt grubu mevcuttur: TRPC (klasik ya da canonical, TRPC 1-7), TRPM (melastatin, TRPM 1-8), TRPV (vanilloid reseptör, TRPV 1-6), TRPA (ankyrin zengin protein, TRPA1), TRPP

(polisistin), TRPML (mukolipin), TRPN (NOMPC, “no mechanoreceptor potential” C).

Memelilerde toplam yedi adet TRPC proteini (TRPC1-7) belirlenmiştir (Tablo 2). TRPC ailesi dizi ve işlevsel benzerliklerine göre 3 alt gruba ayrılmaktadır: TRPC1/4/5, TRPC3/6/7 ve TRPC2/3. (Yu-Juei, Joost G.J and Rene J.M Bindels 2007)

TRPC1 doku dağılımı gösteren bir proteindir. Kas, beyin, kalp, testis, over, endotel hücreleri ve salgı bezlerinde ekspresyon olmaktadır. TRPC1 proteininin subselüler lokalizasyonu ile ilgili olarak TRPC1’in hücre membranında kompartmantalize olduğuna ilişkin genel bir algılama vardır. TRPC1 proteinindeki E576K (E, glutamik asit; K, lizin) ya da D581K (D, aspartik asit) mutasyonların SOCE’yi azaltırken Na⁺ akımını değiştirmemesi bu bölgenin Ca²⁺ selektivitesi için önemli olduğunu göstermektedir. Bu tür mutasyonların Ca²⁺ geçirgenliğini etkileyebileceği düşünülemez.

TRPC3 beyin, düz kas ve kalp kası hücrelerinde eksprese olmaktadır. TRPC3 diasil gliserol (DAG) ile aktive olan TRPC3/6/7 alt gruba dahildir. DAG ile uyarılma TRPC6’nın aksine yüksek bir yapısal aktiviteye sahiptir.

TRPC4 proteini düz kas ve endotelyumda eksprese edilmektedir. TRPC4 geninin siRNA aracılığı ile baskılandığı zaman SOCE’nin azaldığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada katyon kanallarının önemli bir komponenti olduğunu göstermişlerdir (Lee-Kwon W. 2004). Kalp hücrelerinde yaptıkları araştırma sonucunda SERCA2 ekspresyonundaki azalmaya paralel olarak TRPC4 ve TRPC5 ekspresyonlarında belirgin bir artış gözlenmiştir buna sebep ise SERCA2 genini siRNA ile susturulmasıdır. Yaşlanma üzerinde yapılan deneysel çalışmada yaşlı sıçanlarda TRPC1 proteininin ekspresyonu azalırken TRPC6 ekspresyonu artmıştır. Vasküler hücre kültüründe siRNA ile TRPC1 genini baskılanılan bir diğer çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Eraç Y, Selli Çve Tosun M, 2009).

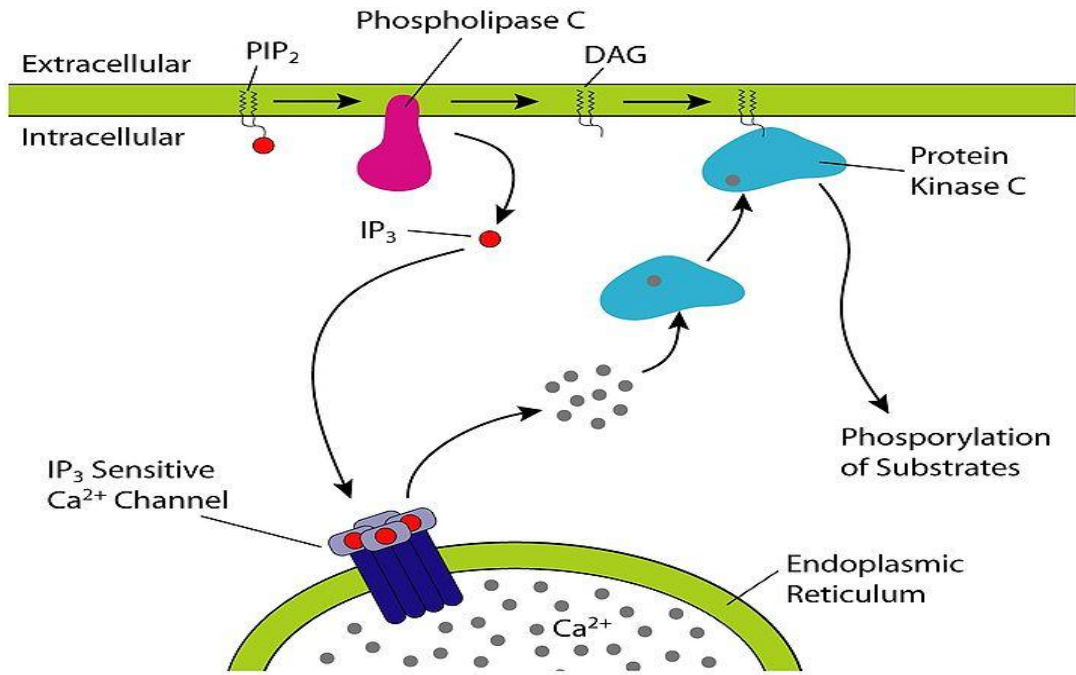
Tablo 2: TRPC Kanalları İçin Önerilen Aktivasyon Mekanizmaları, İşlevleri Ve İlişkili Olduğu Hastalıklar

Gen	Aktivasyon mekanizması	İşlevi	İlişkili olduğu hastalıklar	Kaynaklar
TRPC1	SOC?	Pürkinye hücrelerinde eksitatör postsinaptik akımın oluşumu, mekanosensör, büyüme konisinin yönlendirilmesi	Astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, B hücrelerinde bağışık yanıt yetersizliği, kalp hipertrofisi, nörodejeneratif bozukluklar, Duchenne kas distrofisi	(41-47)
TRPC2	SOC?, DAG	Feromon algılama	Hayvanlarda karşı cinsi tanımda bozukluk, davranış bozukluğu	(48, 49)
TRPC3	SOC, DAG, ekzositoz	BDNF-aracılı nöronal farklılaşma, vazomotor işlev, solunum yolunun düzenlenmesi, büyüme konisinin yönlendirilmesi	İdiyopatik pulmoner arteriyel hipertansiyon, kalp hipertrofisi, esansiyel hipertansiyon	(50-52)
TRPC4	SOC?	vazomotor işlev, mikrovasküler geçirgenlik	Endotelyum-bağımlı gevşeme ve endotelial bariyer işlevinde bozukluk	(53, 54)
TRPC5	SOC?, ekzositoz	Büyüme konisinin yönlendirilmesi, beyin gelişimi		(55)
TRPC6	DAG	Vazomotor işlev, düz kas kasılması, trombosit agregasyonu, mekanosensör	İdiyopatik pulmoner arteriyel hipertansiyon, kalp hipertrofisi, Duchenne kas distrofisi, glomerüloskleroz, Alzheimer hastalığı	(46, 47, 50, 56-58).
TRPC7	SOC?, DAG	Bağışık yanıt	-	(59)

?: SOCC bileşiminde olup olmadığı kesinlik kazanmamıştır.

TRPC6 en fazla akciğer dokusunda yaygın olan ve depodan bağımsız bir şekilde reseptör aracılı aktive olan DAG-duyarlı bir katyon kanalıdır. Katyon kanallar hücre membranının altındaki veziküllerde tutulur ve reseptör aktivasyonuna yanıt olarak hızla hücre membranına taşınır. TRPC6 nın aktivasyonu DAG (Fosfolipaz C aracılığıyla uyarılır) ile gerçekleşir. Diasilgliserol,

bir gliserol molekülüne ester bağları ile kovalent bağlı iki yağ asidi zincirinden oluşmuş bir gliserittir. Biyolojik sinyalizasyonda diasilgliserol ikincil mesajcı olarak çalışır. Fosfolipaz C (PLC) enzimi tarafından fosfatidil inositol-bisfosfat (PIP₂) adlı fosfolipitin hidroliz ürünüdür. Bu enzim hücre zarına bağlı olup aynı reaksiyon ile inositol trifosfat (IP₃) üretir. (Şekil 6) IP₃ sitozola dağılmasına karşın, DAG hidrofobik olması nedeniyle plazma zarında kalır. IP₃ düz endoplazmik retikulumdan kalsiyum iyonlarının salınmasına neden olur, DAG ise protein kinaz C (PKC)'nin fizyolojik aktivatörüdür. Membranda DAG oluşumu, PKC'nin hücre zarından sitozola translokasyonunu kolaylaştırır. Hücrede DAG TRPC3/6/7'nin aktivatörüdür.

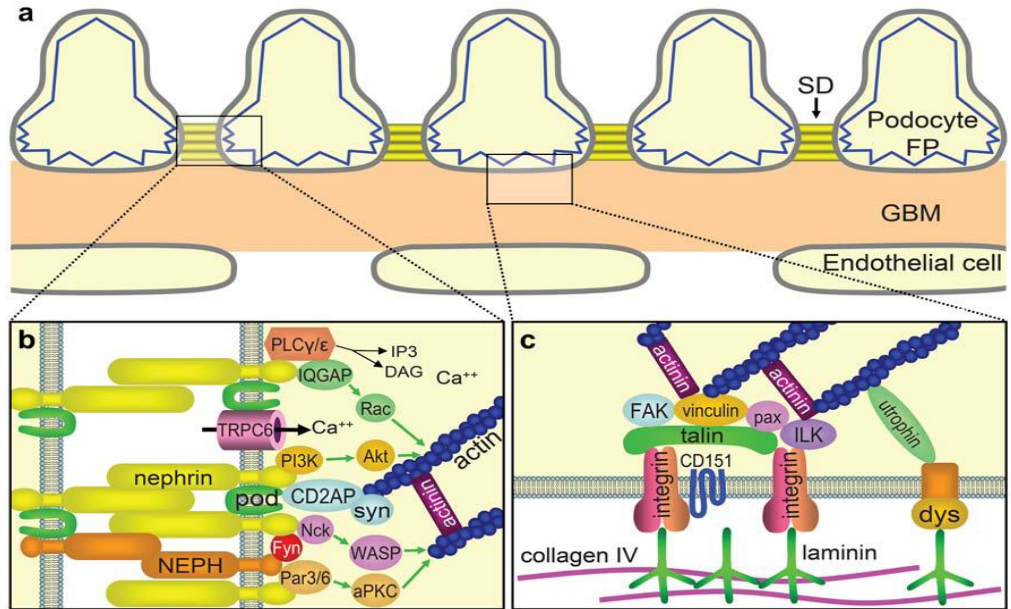


Şekil 6: TRPC6'nın DAG İle Aktivasyonu

(Wikipedia, 2006)

TRPC6 podosin ve lipid kompleksinde kümelenmiş şekilde bulunur ve aynı zamanda nefrinle karşılıklı etkileşme halindedir. Nefrin gibi, TRPC6 da protoonkogen protein tirozin kinaz FYN ile fosforilasyonunun bir hedefidir. Bu da TRPC6 kanal iletkenliğini genişletir ve kalsinörin tarafından defosforilasyon olunmaktadır. FSGS ile ilgili bazı TRPC6 mutantlar TRPC6 aracılı kalsiyum

sinyalleri geliştirmek için gösterildi ancak glomerüler hasarın mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. (şekil 7) Bir nephrin-fyn-TRPC6 sinyal kompleksi silit diyafram bütünlüğünü izlenmesi dahil olacaktır. Bu sinyal düğümleri podosit ayak sürecindeki kalsiyum-bağımlı sinyal kaskadları ile ilgili olabilir. Bu da dinamik, kasılmış podosit aktin içinde adaptiv değişiklikleri uyarır. TRPC6 fonksiyonun bu şekilde değiştirilmesi sonradan ilerleyici hasara yol açabilen podosit sitoskeletonini bozabilir. Başka bir çalışmaya göre podositteki hücreiçindeki apoptoz vastasıyla Ca^{2+} artışı podositopatiyaya neden olmaktadır. Hastalık koşulları altında, TRPC6 fonksiyon değişikliği doğrudan podositin sitoskeletal yanıtını etkileyen ve bu sebeple podosit yaralanması ve podosit ayakcıklarının silinme sırasında önemli bir rol oynamaktadır. (Mukerji N., D, Amodaran T. V. ve Winn M. P., 2007)



şekil 7: SD'de Nefrin-podosin-TRPC6 ilişkisi

(Zenker M., 2009)

TRPC6'nın keşfi yeni glomerüler araştırma için olanaklar yarattı. TRPC6 mutasyonları glomerüler hastalığın kalıtsal biçimlerinin anlaşılması yolunda önemli ipuçları sağlayabilir. FSGS hastalarının genotiplendirilmesi TRPC6 mutasyonunun açıklanmasına sebep olacaktır (Clemens C. Möller, Jan Flesche and Jochen Reiser, 2009).

6.TEDAVİ VE İZLEM

İdiopatik Nefrotik Sendrom tedavide steroide verdiği yanıtı göre steroide yanıtı nefrotik sendrom (SYNS) ve steroide dirençli nefrotik sendrom (SDNS) olmak üzere iki gruba ayrılır. Günümüzde idiyopatik NS'nin prognozunu genetik, çevresel ve epidemiyolojik birçok faktöre rağmen steroid tedavisine yanıt ya da direncin belirlediği kabul edilmektedir (Eddy and Symons, 2003). Bu nedenle steroid yanıtı, ancak bağımlı veya sık ataklı hastalarda remisyonun devamı amacıyla birçok tedaviler denenmiştir.

Çocuk Böbrek Hastalıkları Çalışma Grubu (ISKDC), ilk tanı sonrası hastaların önemli bir bölümünün steroide yanıt verdiğini saptamıştır. Buna göre başlangıçtaki 8 haftalık steroid tedavisine %78 oranında yanıt alınmaktadır. Bu olguların %91.8'i minimal lezyon hastalığı (MLH), kalan %8.2 ise diğer histopatolojilere sahiptir. Hastalar histopatolojik kategorilere ayrıldığında başlangıç steroid tedavisine minimal değişiklik hastalığı %93.1, fokal segmental glomeruloskleroz (FSGS) %29.7, membranoproliferatif glomerulonefrit (MPGN) %6.9 oranında yanıt vermektedir. (Habashy D., 2003)

7.GEREÇ VE YÖNTEMLER

7.1Çalışma Grubu

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı pediatrik Nefroloji Bilim dalında izlenen veya Moleküler Tıp Laboratuvarına başka merkezlerden Podosin analizi için gönderilen SDNS ön tanılı 50 hasta ve 25 sağlıklı kişi çalışma grubunu oluşturmuştur.

Çalışma İzmir 1 nolu Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Kayıt No: 11-7/16) ve çalışmada yer alan hastaların tümünün ebeveynleri genetik çalışmalar için bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalamışlardır (Ek 1).

Çalışmaya 2-12 yaşlı hastalar dahil edilmiştir. Hastaların detaylı anamnezi, öz ve soygeçmişleri alınarak başvuru şikayetleri ve muayene bulguları, analiz sonuçları ile olgu rapor formunda yer almıştır.

Çalışmaya Alınma Kriterleri:

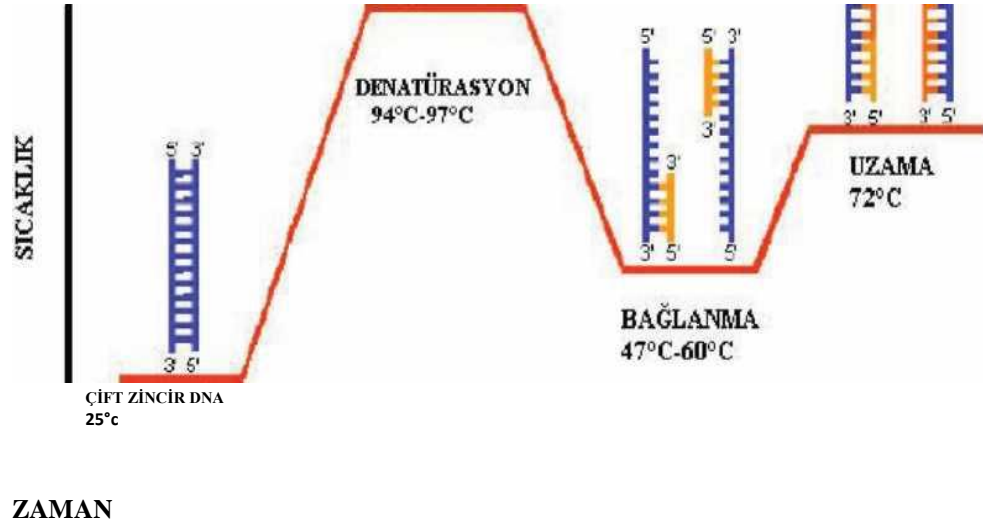
- ✓ Anazarka tarzında ödem ,
- ✓ Proteinüri - 40 mg/m²/saat ve ya üstü
- ✓ Hipoalbuminemia , 2.5gr/l den düşük
- ✓ Hipelipidemi
- ✓ 4 hafta 2mg/kg/gün standart steroid tedavisine yanıt vermeyen hastalar steroid dirençli nefrotik sendrom olarak kabul edildi.

7.2 Yöntem. Denatürasyon ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR; hedeflenmiş DNA molekülü içinden kısa DNA dizisini invitro koşullarda klonlanılması işlemidir. İlk kez Kaliforniya'da Dr. Kary Banks Mullis tarafından 1980'lerde keşfedildi. Dr. Kary Banks Mullis PCR'ın keşfi ve kimyanın Nobel ödülünü almıştır (McPherson and Moller, 2000). Bu yöntemde çoğaltılması (replikasyon) istenen DNA örneği, replikasyon için gereken maddelerle birlikte bir tüpe konarak, üç değişik ısıda bir döngü (siklus) içerisinde tutulur. İlk basamak DNA'nın denatürasyonudur. DNA'nın iki zinciri 94-95°C'de birbirinden ayrılır (denatürasyon). İkinci basamak bağlanmadır (yapışma = annealing). Ortama konmuş ve sadece çoğaltılmak istenen DNA bölgesine özgül iki primer, sıcaklığın (50-70°C'ye) düşürülmesiyle, ilk basamakta ayrılmış olan kalıp DNA'nın özgül oldukları bölgelerine bağlanırlar. Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır (sentez = extension). Optimum sentez sıcaklığı 72-74⁰C olan *Thermus aquaticus* (Taq) polimerazı (ya da ısıya dayanıklı başka polimerazlar) bu ısıda hedef DNA'ya yapışmış primerlerin 3' ucundan başlayarak istenen DNA bölgesinin sentezini yapar (Şekil 8).

Yeni sentezlenen DNA da bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır ve bu DNA parçaları geometrik olarak artar. Teoride özgül DNA parçası; siklus sayısı (n) ve başlangıçtaki hedef sayısına (t) bağlı olarak yaklaşık $tx2^n$ sayısına

ulaşır. Hedef sayısı, enzim, dNTP, primer konsantrasyonu ve çoğaltılan bölgenin birikmesi gibi nedenlerle ürün miktarı formüldeki sayıya ulaşmaz. Fakat milyonlarca kopyalık çok yüksek yoğunluğa ulaşan hedef DNA molekülünün PCR sonrası agaroz jel elektroforezi gibi bir yöntemle gösterilmesi oldukça kolaydır (Kubista et al. , 2006).



Şekil 8: PCR sıcaklık döngüsü:

- (1) Çift iplikli DNA'nın ayrılması için sıcaklık yaklaşık 95°C'ye yükselmiştir,
- (2) primerin bağlanmasına izin verilmesi için sıcaklık primere göre düşürülmüştür,
- (3) sıcaklık 72°C'ye ayarlanarak polimeraz primerin uzaması sağlar.

7.3 DNA Analizi (Sekanslama)

DNA dizi analizi, gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında bir çok bilgi edinmemizi sağlamıştır. 1960'lı yıllarda başlayan DNA dizi analizi ile ilgili araştırmalar başlıca şu şekilde gelişmiştir (Maxam, A., Gilbert, W. 1977). DNA dizi analizleri yada sekanslama DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır.

1977 yılında Allan MAXAM- Walter GİLBERT ve Frederick SANGER tarafından iki farklı DNA dizi analizi yöntemi bulunmuştur. 1982 yılında

Akiyoshi WADA DNA dizi analizinin otomatik olarak yapılmasını önermiş ve robotlar geliştirilmeye başlanmıştır.

DNA Dizi Analizinde günümüzde birbirinden farklı iki yöntem kullanılmaktadır. Bu iki yöntem;

- 1- Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi (Maxam et al.,1977).
- 2- Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi. (Sanger et al.,1977).

Bu iki yöntemden Sanger – Coulson'un yöntemi günümüzde daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP'lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanısıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP' leri de (dideoksiribonükleozit trifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanır. Sentezlenen DNA' ya bir sangddNTP' nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. Sekanslama yapılırken dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanır. Ve bu her bir karışım kalıp DNA zinciri, bir primer, dNTP' lerin dördü ve az miktarda ddNTP' lerden birini içerir. Özgül zincir sonlanması için her bir reaksiyonda farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleotit kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak bir dizi DNA fragmenti meydana gelir (Klug et al., 2000). Bu fragmentlere elektroforez uygulanır. Sanger yöntemin Manuel ve Otomatik Sekans yöntemleri mevcuttur.

7.3.1. Otomatik DNA dizi analizi

Artan analiz sayısı, uzun zaman ve yüksek iş gücü gerektirir. Bu gelişmeler sonucunda otomasyon kaçınılmaz olmuştur. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de yarar sağlamıştır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA' nın bulunduğu jelmatriks bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya

bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Bu veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (Sambrook et al., 1989).

Otomatik dizi analizi cihazları Jel Sistemli Cihazlar (ABI Prism 370, 373, 377) ve Kapiler Sistemli Cihazlar (ABI Prism 310, 3100, 3700). ABI Prism 310 Kapiler sistemli cihaz iki ana parçadan oluşur. Birinci kısım veri ünitesidir. Veri ünitesi bir bilgisayar sisteminden oluşmuştur. Bu bilgisayarda, ikinci kısım ile bağlantıyı kuran ve ikinci kısmı kontrol eden programlar yüklüdür. İkinci kısım analizin yapıldığı elektroforez kısmıdır (Perkin E, 2000). Cihazın çalışma prensibi: Cihaz komutu alınca uygun sıcaklığa ayarlanır. Kapilerin serbest ucu distile su tüpüne girer, bir dizi işlem sonrası polimer kapiler içerisine tek taraflı yayılır. Kapilerin serbest ucu örnek içine girer. Oluşan elektriksel alan sonucu DNA parçaları kapiler boruya taşınır ve akımın kesilmesiyle kapilerin serbest ucu distile su içine döner. Kapillerin serbest ucu temizlenerek yürütme çözeltisine döner. Cihaza ters akım verilir, DNA parçaları kapilerin serbest ucundan polimer bloğa ardından lazer ünitesine geçer ve yaydığı floresan ışıkla tespit edilir.

Otomatik dizi analizinde en sık olarak ABI Prism Big Dye™ Terminatör Reaksiyon Kiti kullanılır. Bu PCR kitinin özelliği tüm PCR kimyasalları ile beraber, floresan boyalı ddNTP'ler ile Taq DNA Polimeraz enzimini de tek bir karışım halinde bulundurmasıdır. Bu ddNTP'lerin her biri farklı bir floresan boya ile işaretlenmiştir. Bu sayede tek bir reaksiyonla dizi analizi yapılabilir. Kit -15 ile -25 °C arasında saklanır. Kit tüm kalıp DNA' lar için ortak bir PCR protokolü içerir ve PCR süresi ortalama 2,5 saattir.

Tablo 3: ABI Prism Big Dye™ terminatör reaksiyon kitinde ddNTP' lerin işaretlendikleri floresan boya isimleri ile bunlara karşılık gelen renkler

ddNTP	Florans Boya	Renk
A	dR6G	Yeşil
T	dROX	Kırmızı
C	dR110	Mavi
G	DTAMRA	Siyah

8. METOD

8.1. DNA İzolasyon

Hastalardan EDTA'lı tüpe alınan 1ml periferik kandan 200µl alınarak genomik DNA elde edildi. Bu yöntem için Invitrogen Purelink Genomic Blood DNA Purification DNA izolasyon mini kiti kullanılmıştır. DNA eldesi işlemleri kit prospektüsüne göre yapıldı. Genomik DNA eldesinin aşamalarında kullanılan solüsyonların amaçları şu şekildedir:

Hücre lizis solüsyonu ile hücre zarının uzaklaştırılıp hücre içeriklerinin açığa çıkmasını, proteinaz K ile tüm hücrel ve nükleer histon proteinlerin ve RNA'nın uzaklaştırılmasını sağlar. Alkolle DNA'nın membranda presipitasyon basamağı ile yıkaması gerçekleştirilir. Membrana bağlama basamakları sonucunda alkol, protein ve membran lipid kontaminasyonlarından uzaklaştırılmış halde en son uygulanan elüsyon basamağında DNA'nın saf olarak eldesi sağlanır. Elüsyon tampon çözeltisi ile membrana bağlı kalan nükleik asidin %85-100'ü elde edilir.

Invitrogen Purelink Genomic Blood DNA Purification (K1820-01) DNA izolasyon mini Kit prosedürü:

Hazırlama

- Su banyosu 550⁰C'ye ayarlanır.
- Her hasta için 1,5 ml'lik ependorf, spin ve kolon tüpler hazırlanır.
- Etil alkol saf olması için yeni olarak hazırlanır. (%95>)

Prosedür

- Steril bir ependorf tüpüne 200µl donmuş ya da taze kan örneği konur
- Üzerine 20 µl Proteinaz-K eklenir.
- 20 µl Rnase A ekleyin ve vortekslenir, oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir.
- 200 µl Genomik/Lysis tamponundan eklenir ve homojen olana

kadar vortekslenir.

- Protein sindirimini hızlandırmak için 550C'de 10 dk. su banyosunda inkübe edilir.
- 200 µl %96-100'lük etil alkol eklenir, 5 saniye kadar vortekslenir.
- Ependorftaki lizattan toplama tüplerine ~640 µl eklenir.
- 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Kolonları atılır ve temiz tüpe yerleştirilir.
- 500 µl Wash Buffer 1 ilave edilir.
- 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra kolonları atılır ve temiz tüpe yerleştirilir.
- 500 µl Wash Buffer 2 ilave edilir.
- 3 dakika maksimum hızda santrifüj edilir. Kolonları atılır ve temiz tüpe yerleştirilir.
- 25-200 µl (ort. 100 µl) Elution Buffer eklenir, 1-2 dakika oda ısısında bekletilir.
- Maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilir.
- Elde edilen DNA toplama tüpünde birikmiştir, burdan mikropipetle ependorfa aktarılarak +4C0'de ya da -200C'de saklanılarak, gerekirse dilüe edilerek kullanılır.

8.2. DNA'nın Kontrolü

2 µl (100 ng) DNA çözeltisi %1'lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez işlemi için agarozdan 2 gr tartılarak 100 uL 1 XTBE tapon çözeltisinden manyetik boncuk ile karıştırılıp mikrodalga fırında eritilmesinin ardından homojen görünüme ulaşmış ve 60 C'ye soğutulmuştur. Üzerine 10 ug/mL konsantrasyonunda etidyum bromide (Sigma Co., S.Louis, MA, USA) solüsyonundan 10 uL ilave edilmiştir. Bu solüsyon DNA interkalasyon yapmakta ve DNA'yı UV ışık altında görünür kılmaktadır. Tank üzerine solüsyonunun eklenmesinin ardından PCR-DNA molekülü 2 uL Loading DYE (2 orange G+4PCR ürünü) karıştırılarak jele yüklenmiştir. Jeldeki DNA, UV transiluminatöründe baz sayısı bilinen standart DNA markırı ile karşılıklı olarak yüklenip, Syngene İnGeneous jel kamera sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

DNA saflığının ölçülmesi için, NanoDrop Spektrofotometre cihazında 260/280 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Kontrolü tamamlanan DNA molekülleri, DNA sekans analizine başlamak üzere +4 C'de saklanmıştır.

8.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

TRPC6 geni için her bir ekzona özgül olan oligonükleotid primerler ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir (Tablo 4). PCR işlemi için toplamda 25 µl olacak şekilde; içerisinde; 1µl genomik DNA , Gene Amp Gold Buffer (15 mmol/l Tris-HCl, pH 8.0, 50 mmol/lKCl), 2.5 mmol MgCl₂ hazırlandı her birinden 50 µmol/l dGTP,dATP, dTTP ve dCTP, 5 pmol forward ve reverse primer ve 1.0U Ampli Taq Gold polimeraz eklenmiştir.

PCR reaksiyonu 1 ul (100 ng) genomik DNA, Enhancer Buffer (20 mM Tris (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) 2.5 uL, d NTP mix karışımı 0.5 uL (0.2 mM), forward primer 1 uL (10 pmol/ul), reverse primer 1 ul (10 pmol/ul) (Invitrogen) , 1.0 U PlatinumTaq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), deiyonize su ile 25 uL total volüme tamamlanmıştır.

MyGene Gradient Thermal Cycler cihazında gradient programında PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

TRPC6 genin PCR işleminde kullanılan forward ve revers primerler NCBI Reference Sequence: NM_004621.5 National Institute of Health'in web sayfasındaki (www.ncbi.nih.gov) RefSeqGene genbank (NCBI Reference Sequence: NG_011476.1) ve protein database referans (NP_004612.2) dizilerinden alınmıştır.

Tablo 4.TRPC6 genin PCR’da kullanılan primer listesi

Exon	Forward (5'→3')	Revers (5'→3')
1	AGTGGGCGAGCCACTTG	GGACTCGGCCACTCCTG
2a	TTAGACGTGAAGTTCTTGGAATC	AACCGTGTCCCATCTTCATC
2b	AAAGGTTATGTTCCGATTGTGG	AACCGTGTCCCATCTTCATC
3	AAAGGTTATGTTCCGATTGTGG	GCTGGTAAATACACCTTGACTCTG
4	ACAGCCAGGCTCCGTCTC	CAACCCTTTATCCTTATTTAGCACC
5	TGTATTTTCATTGGAAAGCATGG	AACCCAACTGTGATTCCCTG
6	GGAGATCATTGGAATGTGCAG	TGGTGCACTGTATCATGCTG
7	TTATAGAACAGCTAAGGCTGAATG	CAGTAACCGAACTACTACTGACATCT G
8	AGACTTCCATTCGAAAACCG	CCAAAACATTATCCCATGGAC
9	CCCATCCTTGCAGCAATC	TGTTGCATTTGGAAGCAAAG
10	CACAATGTTAAAAGCATCCCAG	AAAGGGATGTGGCATAGTGG
11	TGTTGGAGAATTAGACGAAATGG	TGCTTCTGAACATCTGTCCC
12	TGGCAGCCACAAAGTCTAAG	TGTAAGGTTTGCCTTTTCAATG
13	TCCAAAGGGCTCACTACAGG	TGTACGCATCTCTGCAGCTC
14	TTTCCTCCTGTCCCACAGTC	CACAGAGCAGGCAAGAAGG
15	AGTGTCTGCCTGAAAATGGG	TGTAAATGCTCCCAGAAATGG

8.4 PCR Ürünlerinin Purifikasyonu

Elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiş pozitif PCR fragmanları Exo-SAP enzim karışımı (Amersham Life Science,UK) kullanarak purifiye edilmiştir (5:1 oranında). Saflaştırılmış PCR ürünleri yeniden agaroz jel elektroforezine tabi tutularak jelde görüntülenmiştir. Gerekli görüldüğü takdirde amplifikasyon ürünü (Nanodrop)Spektrofotometrede kantite edilmiştir.

8.5 DNA Dizileme

Saflaştırılmış PCR ürünleri BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems U.S.A) kiti kullanılarak DNA dizileme öncesi nükleotidlerin floresan işaretlemesi için ikinci PCR analizine (Cycle-Sequencing PCR) tabi tutulmuştur. Cycle-Sequencing PCR işleminden sonra elde edilecek olan 2. tur PCR ürünlerinin, BigDyeXT kiti (Applied Biosystems U.S.A) kullanılarak presipitasyonları yapılmıştır. Presipite edilerek yeniden saflaştırılmış PCR ürünleri ABI 3130XL Genetic Analyser otomatik DNA sekans sistemine yüklenerek nükleotid dizileri okunmuştur.

DNA dizileme sonucunda nükleotid değişimleri, NCBI Reference Sequence: NM_004621.5 National Institute of Health'in web sayfasındaki (www.ncbi.nih.gov) RefSeqGene genbank (NCBI Reference Sequence: NG_011476.1) ve protein database referans (NP_004612.2) dizileri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 9).

1 ATG AGC CAG AGC CCG GCG TTC GGG CCC CCG AGG GGC AGT TCT CCC 15
16 CCG GGC GCT GCC GGA GCC GCT GCG CCG CCC AAC GAG AGC CAG GAC 30
31 TAT CTG CTC ATG GAC TCG GAG CTG GGA GAA GAC GGC TGC CCG GAA 45
46 CCC CCG CTG CCG TGC TAC GGC TAC TAC CCG TGC TTC CCG GCA TCT 60
61 GAC AAC ASA CTS GCT CAC CCG CCG CAG ACA GTT CTC GGT GAG AAG 75
76 GGG AGA ASB TTA SCT AAT CGA GGA CCA GCA TAC ATG TTT AAT GAT 90
91 CGC TCG ACA ASC CTA TCT ATA GAG GAG GAA CGC TTT TTG GAT GCA 105
106 GGT GAA TAT GGT AAC ATC CGA GTS STG CCG AAG ATG TTA GAA GAA 120
121 TGC CAC TCA CTC AAC GTT AAC TGT STS SAT TAC ATG GGC CAG AAT 135
136 GCC CTA CAG TFG GCA GTG GCC AAT SAS CAT CTS GAA ATT ACA GAA 150
151 CTT CTT CTC AAG AAA GAA AAC CTC TCT CGA STT GSS GAT GCT TTC 165
166 CTT CTA SCT AAT AGT AAA GGT TAT GGT CCG ATT GTS GAA SCA ATT 180
181 CTC AAT CAT CCG GCT TTT GCT GAA GGC AAG AGG TTA GCA ACC ACC 195
196 GGT ASC SAS TCT GAA CTC CAG CAA GAT GAT TTT TAT GCC TAT GAT 210
211 GAA GAT SSG ACA CSS TTC TCC CAT GAT GTG ACT CGA ATC ATT CTG 225
226 GCT GCG CAC TSC SAG SAA TAT SAA ATT STS CAT ACC CTC CTG CCG 240
241 AAG GGT GCT AGG AAT GAA CCG SCT CAT GAT TAT TTC TGC AAG TGC 255
256 AAT GAC TGC AAC CAG AAA CAG AAS CAT GAC TCC TTT AGC CAC TCC 270
271 ACA TCT AGG ATE AAT GCC TAT AAA SGC STS SCA ACT CCG SCT TAC 285
286 CTS TCA TEG TCT AGT GAA GAT CCA GTC ATG ACG SCT TTA SAA CTT 300
301 ASC AAT SAA CTS GCA GTT CTG GCC AAT ATT GAG AAA GAG TTC AAG 315
316 AAT SAC TAC AAA AAA CTG TCA ATG CAG TGC AAA GAC TTT GTT CTT 330
331 GGA CTC CTT GAT CTG TGC AGA AAC ACT GAA GAA GTC GAG GCC ATT 345
346 CTG AAT GGG GAT CTT SAA ACC CTC CAG AGT GGT GAT CAC GGT CCG 360
361 CCA AAT CTC ACC CST TTA AAA CTT GCC ATT AAA TAT GAA GTA AAA 375
376 AAA TTT GTA GCT CAT GCA AAG TSC GAA CAG CAA CTT CTC TCC ATT 390
391 TGG TAT GAG AAT CTT TCT GGT TTA CGA CAG CAG ACA ATG GCG GTC 405
406 AAG TTC CTT GTC GTC CTT GCT GGT GCC ATT SGA CTS CCC TTC CTS 420
421 SCT CTC AAT TAC TGG TTT GCT CCA TGC AGC AAG ATB SSS AAG ATA 435
436 ATG CST GGA CCA TEC ATG AAG TTT GTA GCA CAG SCA SCC TCC TTC 450
451 ACC ATT TTT CTC SGA CTG CTA GTC AAT GCA SCT GAC ASA TTT 465
466 GAA SGC ACA AAA CTC CTT CCT AAT GAA ACC AGC ACA GAT AAT GCA 480
481 AAA CAG CTS TTC ASB ATB AAA ACA TCC TCC TTC TCA TGG ATG GAG 495
496 ATG CTC AAT ATA TCC TSS STA ATA SGC ATG ATA TCG GCT GAA TGT 510
511 AAA GAA ATC TGG ACT CAG GGC CCC AAG SAA TAT TTS TTT GAG TEG 525
526 TGG AAC ATG CTT GAT TTT GAT TTA SCA ATT TTC SCA SCA TCA 540
541 TTC ATT GCG AGA TTC ATG GCA TTT TGG CAT SCT TCC AAA GCC CAG 555
556 ASC ATC ATT GAC GCA AAT GAT ACT TTG AAG GAC TTS ACC AAA STA 570

571 ACA TTG GGA GAC AAT GTG AAA TAC TAC AAT TTG GCC AGG ATA AAG 585
586 TSS GAC CCC TCT GAT CCT CAA ATA ATA TCT GAA GGT CTT TAT GCA 600
601 ATT GCT GEA GTT TTA AGT TTC TCT AGG AFA GCT TAT ATT TTA CCA 615
616 GCA AAT GAA AGC TTT GGA CCT CTS CAG ATA TCA CTT GGA AGA ACA 630
631 CTC AAA GAC ATC TTC AAG TTC ATG STC ATA TTC ATT ATG GTG TTT 645
646 GTG GCC TTT ATG ATT GGA ATG TTC AAT CTC TAC TCC TAC TAC ATT 660
661 GGT GCA AAA CAA AAT GAA GCC TTC ACA ACA GTT GAA GAG AGT TTT 675
676 AAG ACA CTG TTC TGG GCT ATA TTT GGA CTT TCT GAA GTG AAA TCA 690
691 STG STC ATC AAC TAT AAC CAC AAA TTC ATT GAA AAC ATT GGT TAC 705
706 GTT CTT TAT GGA STC TAT AAT AAT ACG ATB GTC ATT GTT TTG CTA 720
721 AAT ATG TTA AAT GCC ATG ATC AAC AGT TCA TTC CAG SAA ATT GAG 735
736 GAT GAC GCT GAT STG SAG TGG AAA TTT GCA AGG SCC AAA CTC TGG 750
751 TTT TCC TAC TTT GAG GAG GGC AGA ACA CTT CCT STA CCC TTC AAT 765
766 CTS GTG CCG AGT CCA AAG TCC CTG TTT TAT CTC TTA CTG AAG CTT 780
781 AAA AAA TSG ATT TCT GAG CTG TTC CAG GGC CAT AAA AAA GGT TTC 795
796 CAG GAA GAT GCA GAG ATG AAC AAG ATA AAT GAA GAA AAG AAA CTT 810
811 GGA ATT TTA GGA AGT CAT GAA GAC CTT TCA AAA TTA TCA CTT GAC 825
826 AAA AAA CAG GTT GGS CAC AAT AAA CAA CCA AGT ATA AGG AGC TCA 840
841 GAA GAT TTC CAT CTA AAT AGT TTC AAT AAT CCT CCA AGA CAA TAT 855
856 CAG AAA ATA ATG AAA AGG CTC ATT AAA AGA TAT GTA CTG CAG GCC 870
871 CAG ATA GAT AAG GAG AGT GAT GAA STG AAC GAA SGG GAA CTG AAG 885
886 GAA ATT AAG CAG GAC ATC TCA AGT CTC CSC TAT GAA CTC CTT GAA 900
901 GAA AAA TCT CAG AAT ACA GAA GAC CTA GCA GAA CTT ATT AGA GAA 915
916 CTT GGA GAG AAA TTA TCC ATG GAA CCA AAT CAA GAG GAA ACC AAT 930
931 AGA TAA

Şekil 9: TRPC6 nukleotid dizisi

9 DEĞERLENDİRME

Sonuçlar SEQSCAPE 2.0 bilgisayar programı ile yapılmıştır. Mega 4 programıyla veriler karşılaştırılmıştır (şekil 10 ve şekil 11).

M4: Alignment Explorer (C:\Documents and Settings\valizada\Desktop\güne\HASTA GRUBU VERILERI\mega\trpc6-3ex.mas)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help

DNA Sequences | Translated Protein Sequences |

TRPC6-3R-HASTA-1	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-2	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-3	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-4	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-5	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-6	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-7	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-8	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-9	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-10	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-11	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-12	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-13	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-14	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-15	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-16	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-17	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-18	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-19	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-20	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-21	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-22	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-23	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-24	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-25	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-26	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-27	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-28	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-29	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-30	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-31	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-32	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-33	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-34	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-35	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-36	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-37	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-38	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-39	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-40	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-41	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-42	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-43	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-44	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-45	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-46	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-47	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-48	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-49	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG
TRPC6-3R-HASTA-50	AACAAATATGTAACGGGCTTACGGCTGACCTTACTTTTTTTTACTTCATATTTAAATGGCAAGTTTTAAATGGTTGAGATTTG

Şekil 10: 50 hastanın 3.eksonun nukleotit dizisinin Mega4 programı vasıtasıyla karşılaştırılması

10. BULGULAR

10.1 DNA Sekans Analizi Bulguları

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı pediatrik Nefroloji Bilim dalında izlenen veya Moleküler Tıp Laboratuvarına başka merkezlerden Podosin analizi için gönderilen SDNS ön tanılı 50 hasta ve 25 sağlıklı kişi çalışma grubunu oluşturmuştur.

Çalışmaya dahil edilen SDNS'lu hastalarda yapılan genetik incelemeler sonucunda hastalıkla ilişkili TRPC6 gen mutasyonuna rastlanmamıştır. Ancak 50 hasta bireylerinde farklı polimorfizmler saptanmıştır. 50 hastanın 30 bireyinde c.171 + 20 A>G; c.171 + 86 G>C homozigot ve heterozigot intronik değişim, 8 bireyinde Ala404Val, 16 bireyinde Asn561Asn, 2 bireyinde Phe843Phe, 12 hastada Pro15Ser polimorfizmi ve 6 bireyin 3'UTR bölgesinde 552T>G nukleotid değişimi izlenmiştir. İzlenen nukleotid değişimleri sağlıklı hasta ekzonları ile karşılaştırılmıştır.

Pro15Ser tek nukleotid polimorfizmi TRPC6 genin 1. Eksonun 43. nukleotid pozisyonunda C>T (CCC>TCC) yerdeğişimi heterozigot olarak saptanmıştır. Bu nukleotid yerdeğişimi Prolin15Serin aminoasit mutasyonuna neden olmaktadır. Belirtilen pozisyonlardaki prolin serin değişimi C-T transisyonundan ileri gelmektedir.

Ala404Val tek nukleotid polimorfizmi TRPC6 genin 4. Eksonun 1211. nukleotid pozisyonunda C>T (GCG>GTG) yerdeğişimi heterozigot ve homozigot olarak saptanmıştır. Bu baz değişimi Alanin404Valin aminoasit mutasyonuna sebep olmaktadır ve alanin valin değişimi C-T transisyonundan ileri gelmektedir.

Asn561Asn polimorfizmi TRPC6 genin 6. Eksonunda 1683. nukleotid pozisyonunda T>C yerdeğişimi (AAT>AAC) heterozigot ve homozigot olarak saptanmıştır. Asparajin asparajin sinonim aminoasit yerdeğişimi T-C primidin grup transisyonundan ileri gelmektedir.

Phe843Phe polimorfizmi TRPC6 geninin 11. eksonunda 2529. nukleotid pozisyonunda C>T yerdeğişimi (TTC>TTT) heterezigot olarak saptanmıştır. Bu nukleotid yerdeğişimi fenilalanin fenilalanin sinonim aminoasit değişimine neden olmaktadır.

TRPC6 genin 1. intron bölgesinde IVS 171+20 A>G ve 171+86 G>C heterezigot ve homozigot nukleotid yerdeğişimi saptanmıştır.

TRPC6 genin 3'UTR bölgesinde 552 T>G heterezigot nukleotid yerdeğişimi saptanmıştır.

Heterezigot ve homozigot polimorfizimli hastalar ve hiçbir polimorfizm ve mutasyon taşımayan bireylerin DNA sekans analizi elektroforegram sonuçları gösterilmiştir (Tablo 5, şekil 12, 13, 14, 15,16, 17, 18, 19).



Şekil 12: 1.hastanın 1. Ve 2. Eksonlarının DNA sekans analizi elektroforegramı



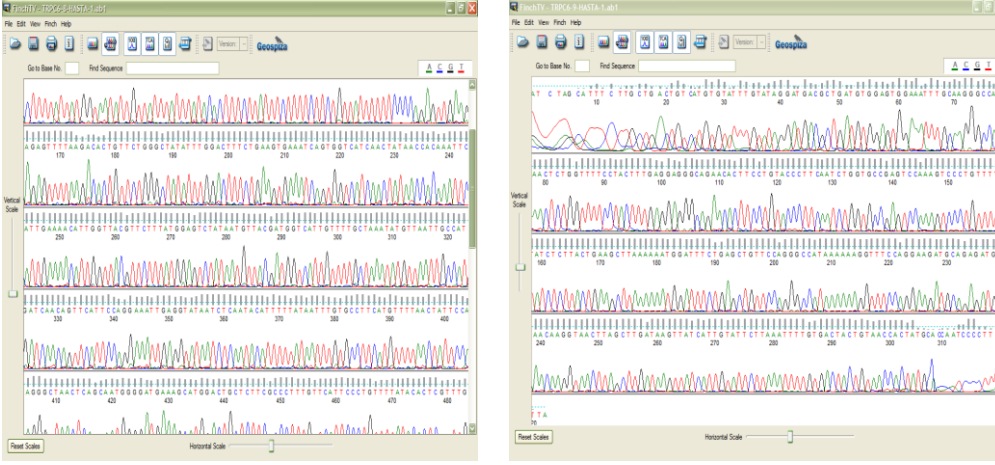
Şekil 13: 1.hastanın 2.2. Ve 3. Eksonlarının DNA sekans analizi elektroforegramı



Şekil 14: 1.hastanın 4. Ve 5. Eksonlarının DNA sekans analizi elektroforegram



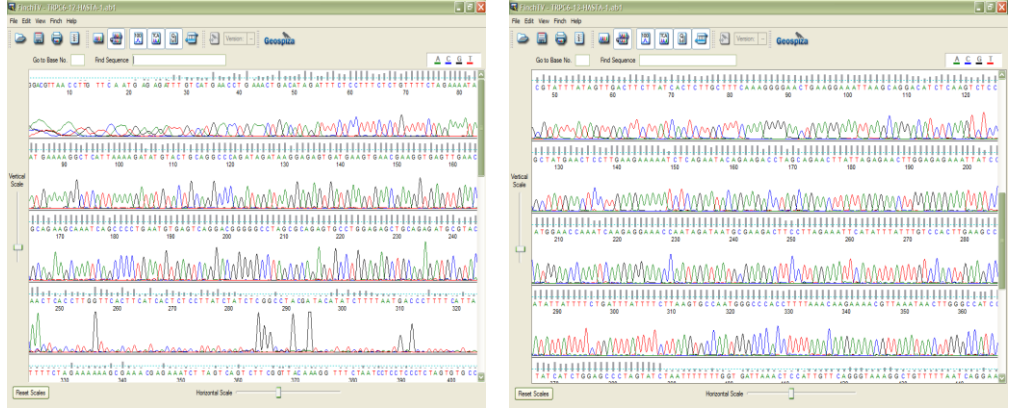
Şekil 15: 1.hastanın 6. Ve 7. Eksonlarının DNA sekans analizi elektroforegram



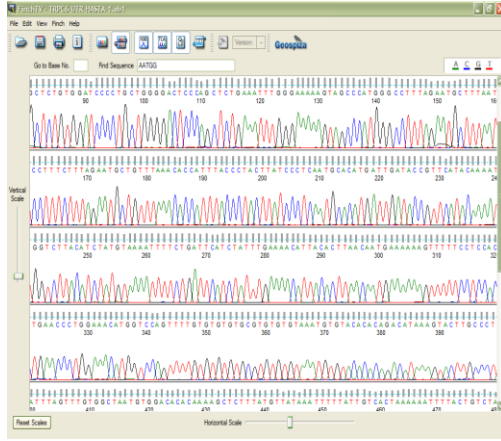
Şekil 16: 1.hastanın 8. Ve 9. Eksonlarının DNA sekans analizi elektroforegramı



Şekil 17: 1.hastanın 10. Ve 11. Eksonlarının DNA sekans analizi elektroforegramı



Şekil 18: 1.hastanın 12. Ve 13. Eksonlarının DNA sekans analizi elektroforegramı



Şekil 19: 1.hastanın 3'UTR bölgesinin DNA sekans analizi elektroforegramı

Yaptığımız çalışma sonucunda hastalıkla ilişkisi bilinmeyen ve proteini nasıl etkilediğini bilmediğimiz DNA varyantları tanımlanmıştır.

Çalışma sonucunda 7.Hastanın 1-ci intronunda IVS-171+20a/g heterozigot, 171+86 g/c heterozigot intonik nukleotid değişimi izlenmiştir (şekil 20). 6. Hastanın 4. Eksonunda Ala404Val (GCG>GTG) tek nukleotid değişim tanımlanmıştır. Diğer hiçbir eksonlarında nukleotid değişimi saptanmamıştır.

9. hastanın 1. Eksonunda Pro15Ser (CCC>TCC) heterozigot tek nukleotid polimorfizm, 1.intronunda c171+20a/g homozigot,c171+ 86 g/c homozigot nukleotid değişim, 4. Eksonunda Ala404Val (GCG>GTG) homozigot tek nukleotid polimorfizm, 6. Eksonunda Asn561Asn (AAT>AAC) sinonim aminoasit değişimi saptanmıştır (Şekil 21).

10. hastanın 1.intronunda c171 +20a/g heterozigot.,c171+86 g/c heterozigot nukleotid değişimi ve 6. eksonunda Asn561Asn (AAT>AAC) sinonim aminoasit değişimi saptanmıştır (Şekil 22, Şekil 27).

11.,12. ve 13. Hastanın 1. eksonunda Pro15Ser (CCC>TCC) heterozigot tek nukleotid polimorfizm, 1. İntronunda c171+20a/g heterozigot, c171+86 g/c Heterozigot nukleotid değişimi tanımlanmıştır (Şekil 25).

14. hastanın 1.intronunda c171+20a/g heterozigot,c171+86 g/c heterozigot nukleotid değişimi, 4. Eksonunda Ala404Val (GCG>GTG) heterozigot tek nukleotid değişimi ve aynı zamanda 3'UTR bölgesinde 552 T>G Het. nukleotid değişimi saptanmıştır (Şekil 28).

15. hastanın 1.intronunda c171+20a/g heterozigot,c171+86 g/c heterozigot nukleotid değişim, 4. Eksonunda Ala404Val (GCG>GTG) heterozigot tek nukleotid değişimi tanımlanmıştır.

16.ve 17. Hastanın 1.intronun da 171+20a/g heterozigot, c171+86 g/c heterozigot nukleotid değişimi izlenmiştir.

18. ve 19. Hastanın 4. Eksonunda Ala404Val (GCG>GTG) heterozigot tek nukleotid değişimi aynı zamanda 6. Eksonunda Asn561Asn (AAT>AAC) heterozigot sinonim aminoasit değişimi saptanmıştır.

20. hastanın 1.intronunda 171+20a/g heterozigot,c171+86 g/c heterozigot nukleotid değişimi ve 4. Eksonunda Ala404Val (GCG>GTG) heterozigot tek nukleotid değişimi tanımlanmıştır.

21.,23.,34,35.,40 ve 42. hastanın 1.intronunda 171+20a/g heterozigot,c171+86 g/c heterozigot nukleotid değişimi saptanmıştır.

26., 32ve 38. hastanın 1.eksonunda Pro15Ser (CCC>TCC) heterozigot tek nukleotid polimorfizm tanımlanmıştır.

27. ve 33. hastanın 1.intronunda 171+20a/g heterozigot, c171+86 g/c heterozigot nukleotid değişimi, 6.eksonda Asn561Asn heterozigot sinonim aminoasit değişimi saptanmıştır.

29. hastanın 1.intronunda 171+20 a/g heterozigot, c171+86 g/c heterozigot nukleotid değişimi, 3'UTR kısmında 552 T>G heterozigot nukleotid değişimi tanımlanmıştır.

30. ve 31. Hastaların 1.intronunda 171+20a/g heterozigot,c171+86 g/c heterozigot nukleotid değişimi, 6.eksonunda Asn561Asn sinonim aminoasit değişimi aynı zamanda 3'UTR kısmında 552 T>G heterozigot nukleotid değişimi saptanmıştır.

36. ve 39.hastanın 1.eksonunda Pro15Ser (CCC>TCC) heterozigot nukleotit değişimi, 1.intronunda 171+20a/g heterozigot,c171+86 g/c heterozigot nukleotid değişimi, 6.eksonunda Asn561Asn sinonim aminoasit değişimi aynı zamanda 3'UTR kısmında 552 T>G heterozigot nukleotid değişimi saptanmıştır.

43.hastanın 1.eksonunda Pro15Ser (CCC>TCC) heterozigot nukleotit değişimi, 2.eksonunda 171+20a/g Hom.,c171+86 g/c homozigot nukleotid değişimi, 6.eksonunda Asn561Asn (AAT>AAC) sinonim aminoasit değişimi tanımlanmıştır.

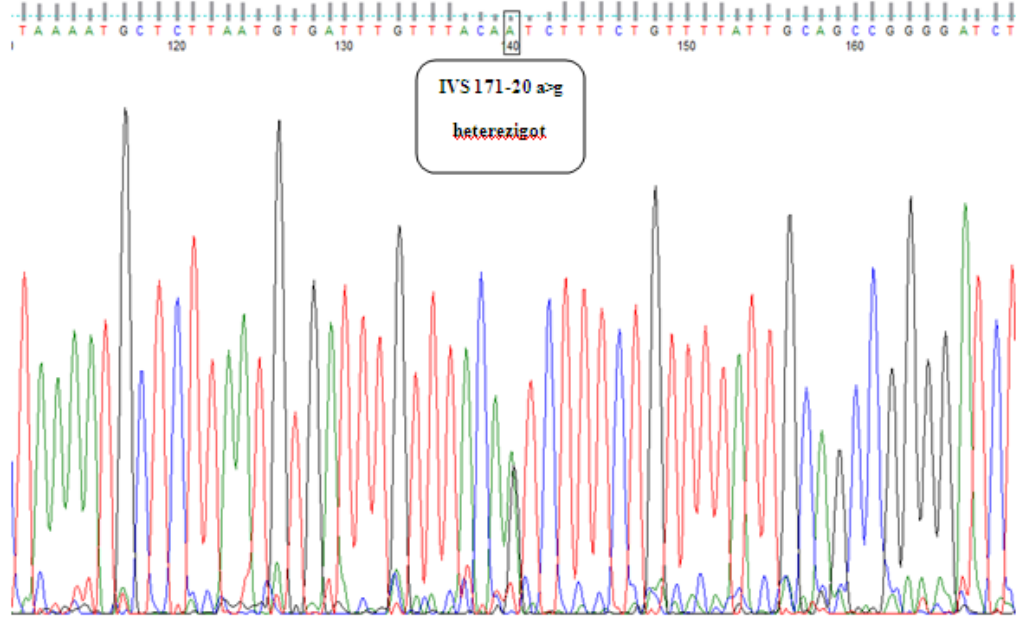
44.hastanın 1.intronunda 171+20a/g heterozigot,c171+86 g/c homozigot nukleotid değişimi aynı zamanda Asn561Asn (AAT>AAC) homozigot sinonim aminoasit değişimi saptanmıştır. (şekil 23)

45.hastanın 1.intronunda 171 +20a/g heterozigot, c171 +86 g/c homozigot nukleotid değişimi aynı zamanda Asn561Asn (AAT>AAC) heterozigot sinonim aminoasit değişimi saptanmıştır.

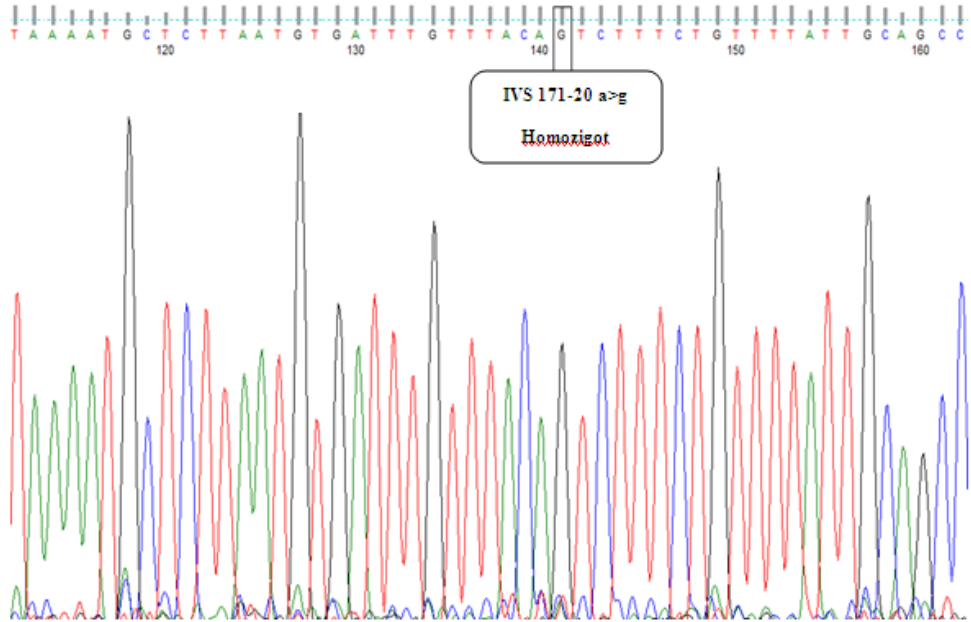
46. ve 47. Hastaların 1.intronunda 171+20a/g Het.,c171 +86 g/c Het. nukleotid değişimi, Asn561Asn (AAT>AAC) heterozigot sinonim aminoasit değişimi aynı zamanda 11.eksonunda Phe843Phe (TTC>TTT) sinonim aminoasit değişimi tanımlanmıştır (şekil 24).

50.hastanın 1.eksonunda Pro15Ser (CCC>TCC) heterozigot nukleotid değişimi, 1.intronunda 171 + 20a/g homozigot, c171 + 86 g/c homozigot nukleotid değişimi, 4.eksonunda Ala404Val heterozigot tek nukleotid polimorfizmi, 6.eksonunda Asn561Asn (AAT>AAC) heterozigot sinonim aminoasit değişimi tanımlanmıştır (şekil 26).

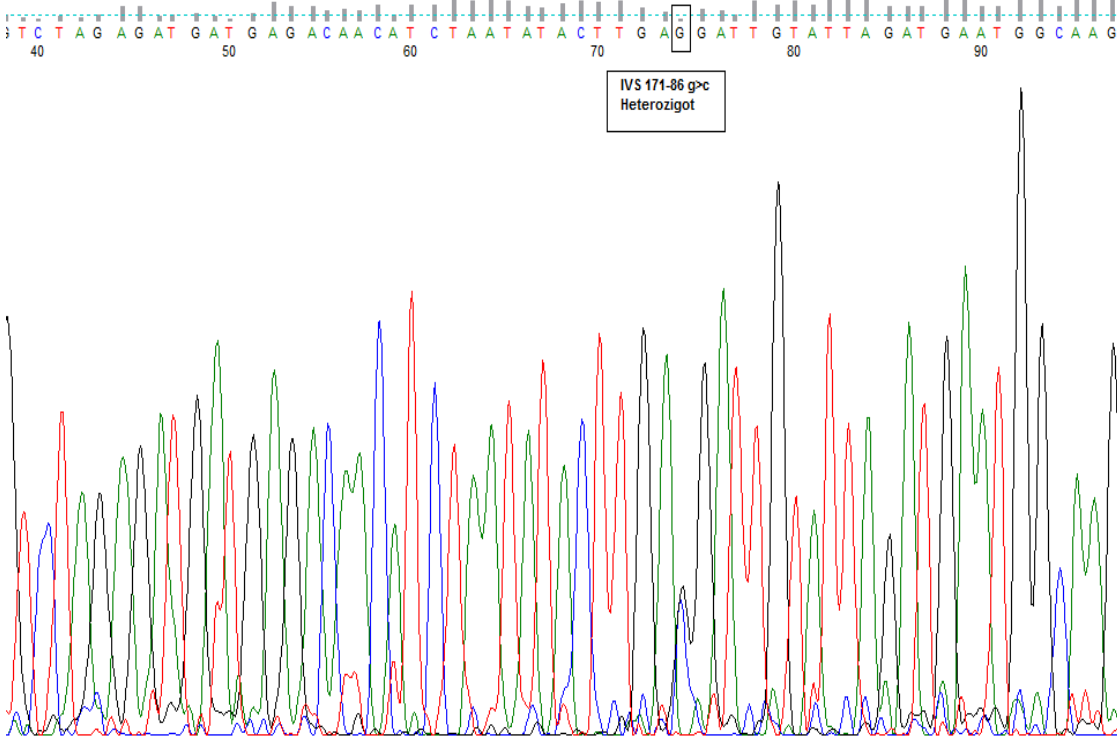
1.,2.,3.,4.,5.,8.,22.,24.,25.,28.,37.,41. Ve 48. Hastada yapılan DNA dizileme sonucunda hiçbir eksonunda nukleotid değişimi izlenmemiştir.



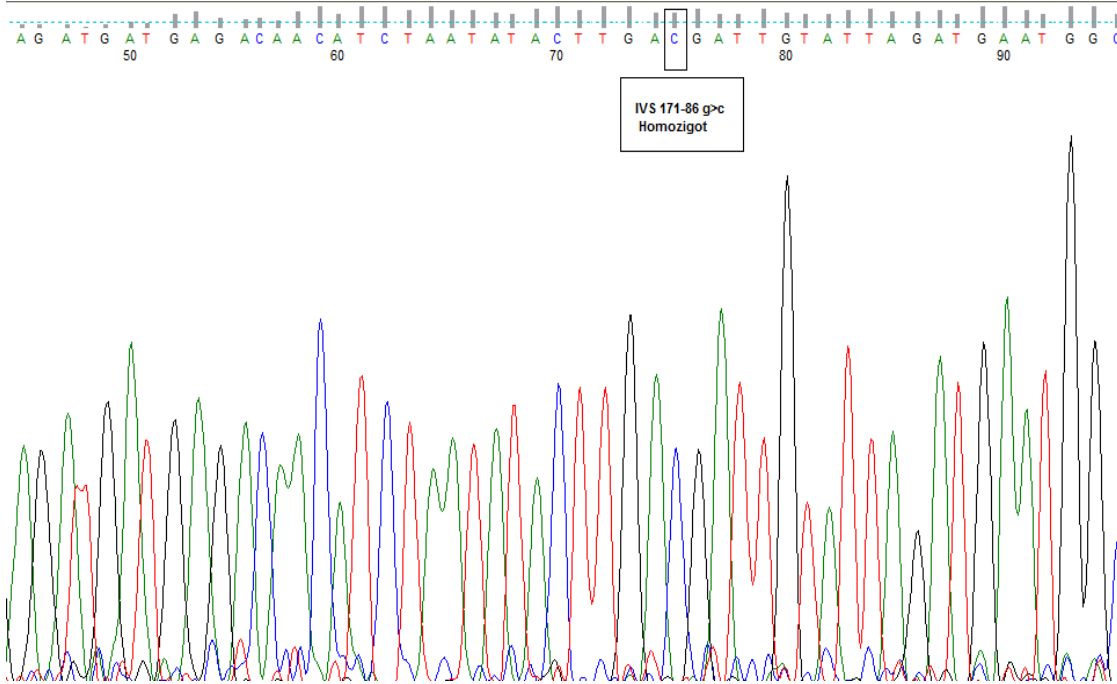
Şekil 20: 7. Hastanın intron bölgesinde heterozigot nukleotid yerdeğişimi (c.171+20 A>G)



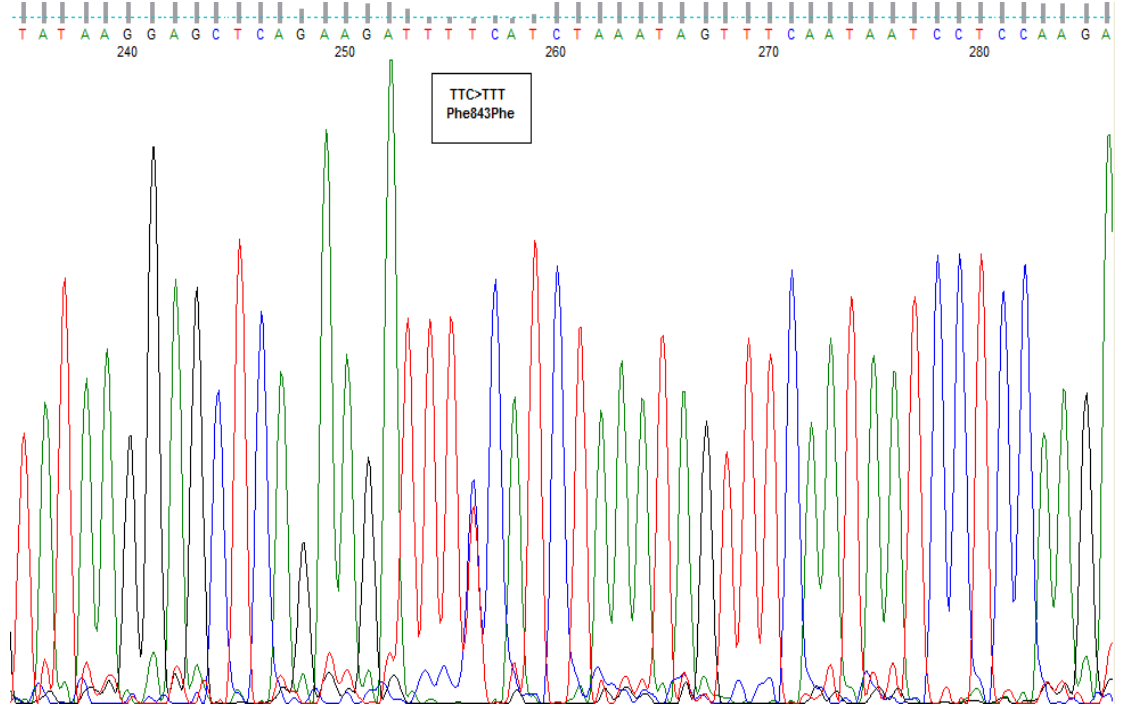
Şekil 21: 9. Hastanın intron bölgesinde homozigot nukleotid yerdeğişimi (c.171+20 A>G)



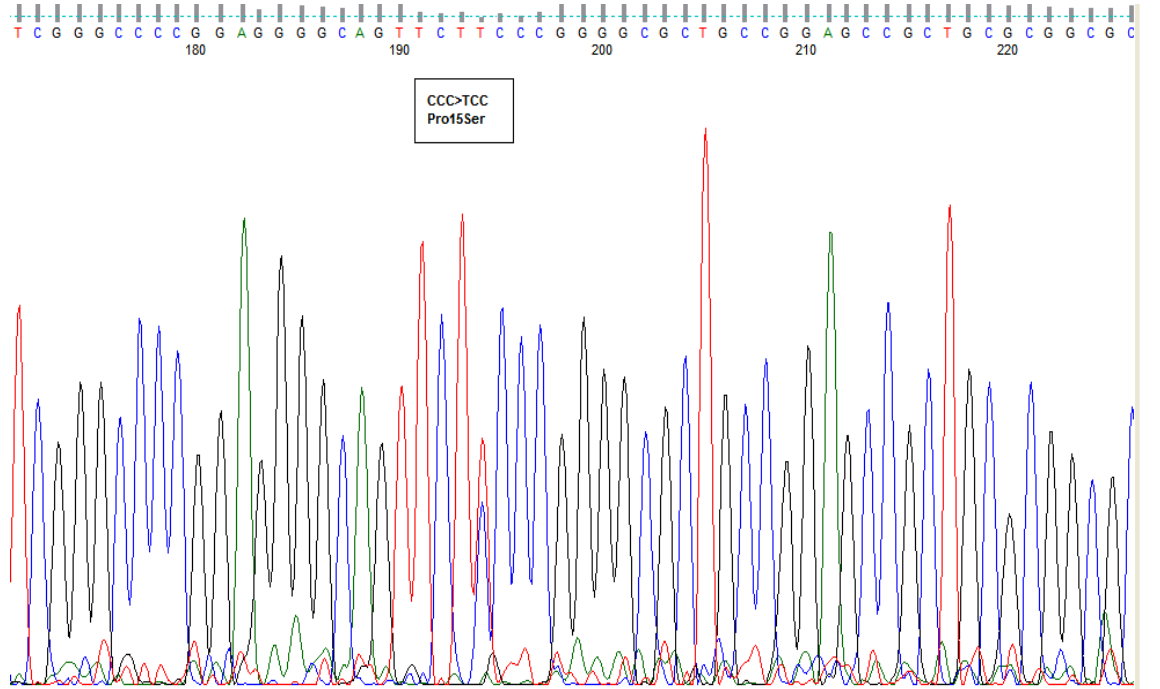
Şekil 22: 10. Hastanın intron bölgesinde heterozigot nukleotid yerdeğişimi (c.171+86 G>C)



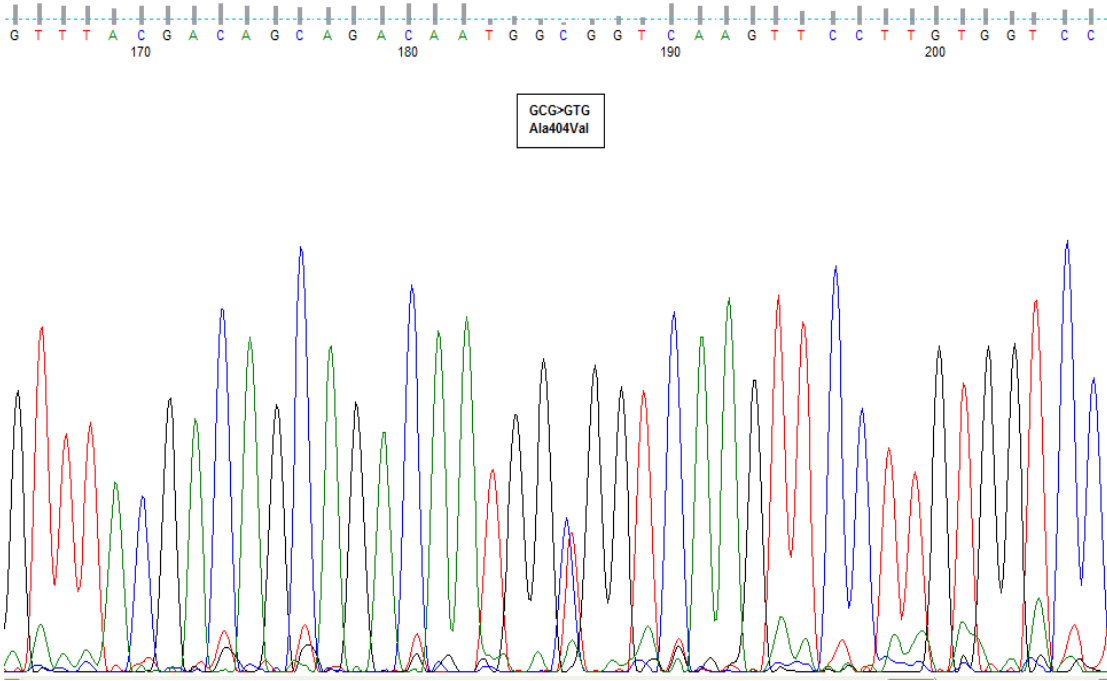
Şekil 23: 44. Hastanın Intron bölgesinde homozigot nukleotid yerdeğişimi (c.171+16 G>C)



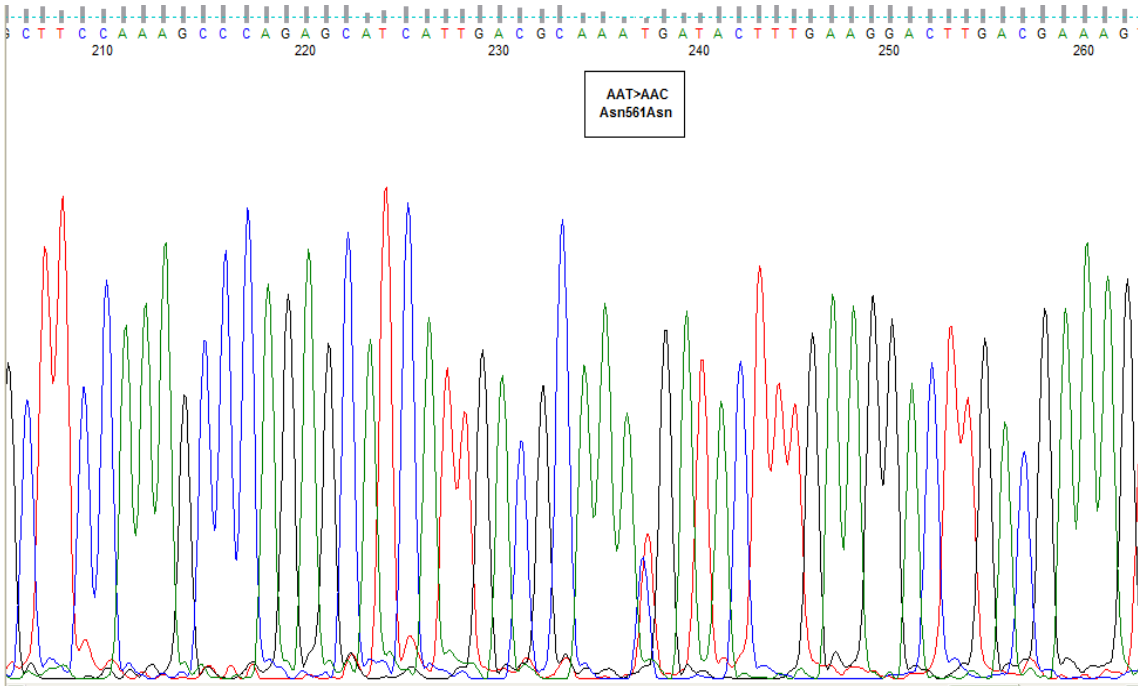
Şekil 24: 47. Hastanın 11. eksonundaki Phe843Phe843 polimorfizmi (TTC>TTT)



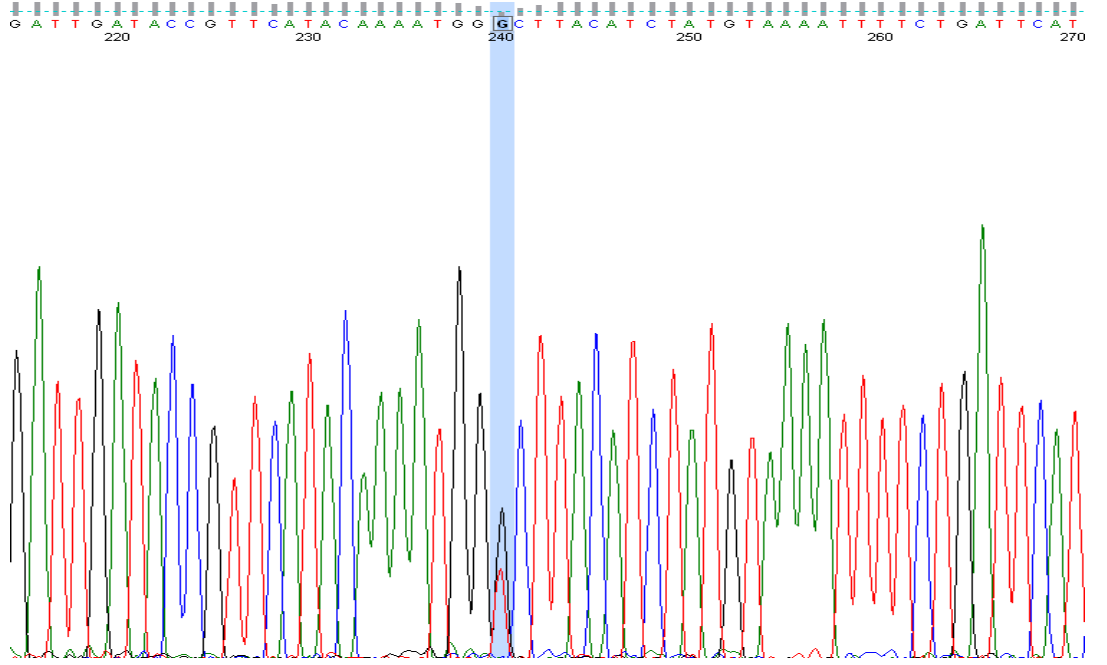
Şekil 25: 12. Hastanın 1.eksonunda Pro15Ser heterozigot polimorfizmi (CCC>TCC)



Şekil 26: 50. Hastanın 4. eksonunda A404V heterozigot polimorfizm (GCG>GTG)



Şekil 27: 10. Hastanın 6. eksonundaki N561N heterozigot polimorfizm (AAT>AAC)



Şekil 28: 14. Hastanın 3' UTR+552 T>G Heterozigot nkleotid değişimi.

11. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

İdiopatik NS'un insidansı 100.000 çocukta 2-2.7 olgu olarak bildirilmekte ve son 30 yıldır bu oranda değişiklik olmamaktadır, ancak günümüzde farklılık olarak bildirilen SDNS'lu olguların tüm INS olguları içinde %10 oranından %27'lere yükselmesidir (Kim et al, 2005; McBryde et al., 2001). Podosit ve GBM ilişkisinin bozukluğu, podositin kontraktilite bozukluğu, podositin negatif elektriksel yükün değişmesi, proteinüriye yol açabilir (McBryde et al., 2001).

Podosit hücreleri slit membranın üzerinde yeni bir protein belirlenmiştir ve bu proteini kodlayan gen haritalanmış ve TRPC6 olarak isimlendirilmiş olan bir kalsiyum kanal reseptörüdür ve mutasyonunun FSGS tip 2'ye yol açtığı bilinmektedir. Steroid dirençli nefrotik sendromda proteinüri oluşumuna yol açan moleküler mekanizmanın araştırılarak, hastaların tedavi seçiminde ve tedaviye yanıtın önceden tahmin edilebilmesinde ve izlemde gelişebilecek son dönem böbrek yetmezliğini ve böbrek transplantasyonun kararında yol gösterici bir prediktif kriter olarak kullanılmıştır.

P112Q Mutasyonu, ilk kez Winn M.P ve ark. tarafından tanımlanmıştır. (Winn, 2005) Çalışmaya, otozomal dominant FSGS'li hastalar dahil edilmiştir. Genetik tarama Yeni Zellandalı hastalara yapılmış ve ayrıca, bilinen bir böbrek hastalığı olmayan Kafkas kontrolleri bir grup taranmıştır. Tarama sonucunda 11. kromozomda mutasyon saptamıştır. TRPC6 geni, 2. ekzonu üzerinde tanımlanan bu missense mutasyon 335. nükleotide C>A değişimi ile TRPC6 proteinin fonksiyonunda önemli bir hasara neden olmaktadır. 112 pozisyonunda Prolin(Pro,P) Glutamine (Gln,G) değiştirilmiştir. Fiziko-kimyasal özelliklerine bakılırsa hidrofobik olan prolin amino asiti hidrofilik olan glutamin amino asitine değiştirilmiştir. P112Q mutasyonun etkisinin TRPC6 fonksiyonunda belirlemek için Winn ve ark. mutant (TRPC6P112Q) ve ya wild-type (WT) TRPC6 ile transfekte olunmuş HEK 293 hücresinde araştırmalarını yapmışlar ve diaçilgliserol (DAG) TRPC6 için güçlü bir aktivatör olduğu öğrenmişlerdir. Çalışmalar sonucunda FSGS2'ye neden olan TRPC6 geni belirlenmiştir. Bu çalışma TRPC6 kronik böbrek hastalığı tedavisinde faydalı bir tedavi hedefi olabilmesi olasılığını yükseltmiştir.

R895C Mutasyonu, ilk kez 2009 de Jochen Reiser ve ark. (Reiser J et.,al., 2009) tarafından 2983. nükleotitte C>T değişimi sonrasında oluşan bir missense mutasyon olarak tanımlanmıştır. Böbrek hastalığı TRPC6 gen varyasyonu rolünü araştırmak için, ailesel FSGS olan 71 pedigre probandlarında (propositus) TRPC6 genindeki değişiklikler için DNA sekans yöntemiyle tarama yapılmıştır. Taranmış bu 71 hastanın % 49 Batı Avrupa, % 5 Afrika ve % 27 İspanyol kökenliydi. Kodlanmış gen ürününde akraba olmayan beş ailede farklı heterozigot dizi varyantları tespit edilmiştir: R895C, N143S, S270T, K874Stop ve E897K. **R895C** mutasyonunda hidrofilik arjinin (R) hidrofilik özel amino asiti sisteinle (C) yer değişimi izlenmiştir (R895C, p.Arg895Cys). Bu mutasyon TRPC6 geninin C-terminal intrasellüler domain bölgesindedir. Her iki ucu ile protein-protein etkileşiminde yer almaktadır. R895C mutasyonu FSGS2'ye neden olmaktadır. Proteinüri ile sonuçlanan bir böbrek patolojisidir. R895C mutasyonu TRPC6 kanlarında Ca giriş regulesini etkilediğinden in vivo Ca miktarının artmasına sebep olmaktadır.

E897K mutasyonu, ilk kez Jochen Reiser ve ark. (Reiser J., 2009) tarafından 2698. nükleotitte G>A değişimi sonrasında oluşan bir missense mutasyon olarak tanımlanmıştır. Hidrofilik glutamik asit hidrofilik lizine değişmiştir. TRPC6 nın C terminali intrasellüler olarak yerleşmekte ve her iki ucu ile protein-protein etkileşiminde yer almaktadır. R895C mutasyonu gibi **E897K**'de FSGS2'ye neden olmaktadır. TRPC6 kanlarında Ca giriş düzenlenmesini etkilediğinden in vivo Ca miktarının artmasına sebep olmaktadır.

N143S mutasyonu, ilk kez Jochen Reiser ve ark. (Reiser J., 2009) tarafından 428. nükleotitte A>G değişimi sonrasında oluşan bir missense mutasyon olarak tanımlanmıştır. Hidrofilik asparajin hidrofilik serin amino asitine değişmiştir. Serin amino asiti hücre içinde önemli yere sahiptir. Bu amino asit proteinin 3 boyutlu katlanmasını değişip veya düzeltebilir. Bu yolla gerçekleşen işlev sayesinde de sitoplazma ve nukleusa bilgi iletimi sağlanır. TRPC6 nın N-terminali intrasellüler olarak yerleşmekte ve her iki ucu ile protein-protein etkileşiminde yer almaktadır. 2. ankirin ANK tekrarıdır.

S270T mutasyonu, ilk kez Jochen Reiser ve ark. (Reiser J., 2009) tarafından 808. nükleotide T>A değişimi sonrasında oluşan bir missense mutasyon olarak tanımlanmıştır. Hidrofilik serin hidrofilik treonin amino asidine değişmiştir. Serin ve treonin amino asitleri hücre içinde önemli yere sahiptir. Bu amino asit proteinin 3 boyutlu katlanmasını değiştirip veya düzeltebilir. Bu yolla gerçekleşen işlev sayesinde de sitoplazma ve nükleusa bilgi iletimi sağlanır. TRPC6'nın N-terminali intrasellüler olarak yerleşmekte ve her iki ucu ile protein-protein etkileşiminde yer almaktadır.

K874Stop veya K874X mutasyonu, ilk kez Jochen Reiser ve ark. tarafından tanımlanmıştır. TRPC6'nın C-terminali intrasellüler olarak yerleşmekte ve stop koduna neden olduğu için proteinin trunkasyonuna götürmekte ve TRPC6 proteinin C terminali kaybolmaktadır.

N143S, S270T and K874Stop mutasyonları R895C ve E897K mutasyonların aksine TRPC6 kanallarında in vivo Ca miktarının artmasına sebep olmamaktadır (Reiser J et., al., 2009).

M132T mutasyonu, ilk kez 2009 senesinde Saskia F. ve ark. tarafından 495. nükleotide T>C değişimi sonrasında oluşan bir missense mutasyon olarak tanımlanmıştır. (Saskia F. H et.al., 2009) Hidrofobik metiyonin hidrofobik triptofan amino asidine değişmiştir. Metil grubu ve kükürt atomu içeren metiyonin özel hidrofobik bir amino asittir. TRPC6'nın N-terminali intrasellüler olarak yerleşmekte ve her iki ucu ile protein-protein etkileşiminde yer almaktadır. İkinci ankirin ANK tekrarıdır. Wild tip kanalın aksine M132T mutasyon kanal inaktivasyonu göstermemiştir.

N143S ve M132T mutasyonlar TRPC6 proteinin N intrasellüler ucundan aynı Ankirin etki alanı içinde yer almaktadır, her iki mutasyon kanal fonksiyonu ile ilgili etkisi araştırmak amaçlanmıştır. Bu nedenle, Ca²⁺ kanal aktivasyonunu artışı belirlemek için M132T/N143S mutasyonların etkisini test etmişlerdir. M132T mutant tek başına büyük bir artış göstermemiştir. Diğer mutasyonlarla

kıyaslama da M132T mutasyonu daha az Ca^{2+} kanalına etki etmektedir. Az da olsa bu mutasyonlu hastalarda Ca^{2+} artışının olması erken başlangıçlı FSGS'ye neden olabilir. (Saskia F. H et., al.,2009)

2009 senesinde Sheila S. ve ark. tarafından 130 İspanyol hastalar arasında yeni bir çalışma yapılmıştır. Bu hastalardan 115-i akrabalık ilişkisi olmayan FSGS'li hastalardan oluşmuştur. Çalışma sonucunda 3 yeni heterozigot missense mutasyon tanımlanmıştır: G109S, L780P ve N125S (Santin et., al., 2009)

G109S mutasyonu, 2. ekzonda 325. nükleotitte G>A değişimi sonrasında oluşan bir missense mutasyon olarak tanımlanmıştır. Ne hidrofilik ne de hidrofobik amino asit olan özel glisin amino asiti hidrofilik aminoasite yer değiştirmiştir. Birinci ankirin tekrarıdır. TRPC6'nın N-terminali intrasellüler olarak yerleşmekte ve her iki ucu ile protein-protein etkileşiminde yer almaktadır.

L780P mutasyonu, 9. ekzonda 2339. nükleotitte T>C değişimi sonrasında oluşan bir missense mutasyon olarak tanımlanmıştır. Hidrofilik lösin amino asit özel prolin aminoasite yer değiştirmiştir. Birinci ankirin tekrarıdır. TRPC6'nın C-terminali intrasellüler olarak yerleşmekte ve her iki ucu ile protein-protein etkileşiminde yer almaktadır.

N125S mutasyonu, 2. ekzonda 374. nükleotitte A>G değişimi sonrasında oluşan bir missense mutasyon olarak tanımlanmıştır. Hidrofilik asparajin amino asit hidrofilik serin aminoasite yer değiştirmiştir. Birinci ankirin tekrarıdır. TRPC6'nın N-terminali intrasellüler olarak yerleşmekte ve her iki ucu ile protein-protein etkileşiminde yer almaktadır.

L780P mutasyonu FSGS'ye neden olan TRPC6 gen mutasyonları klinik fenotip açısından özel yere sahiptir. Nedeni TRPC6 genindeki bu mutasyon klinik fenotipe yol vermek için uzun bir zaman alır.

R175Q mutasyonu, ilk kez 2013 senesinde Julia M. Hofstra ve ark. tarafından (Hofstra et.,al., 2013) 2. ekzonda 524. nükleotide G>A değişimi sonrasında oluşan bir missense mutasyon olarak tanımlanmıştır. Hidrofilik arjinin hidrofilik glutamin amino asidine değişmiştir. TRPC6'nın N-terminali intrasellüler olarak yerleşmekte ve her iki ucu ile protein-protein etkileşiminde ve Ca²⁺ kanal aktivitesinin regülasyonunda yer almaktadır. Üçüncü ankirin ANK tekrarıdır. Bu ankirin 3 tekrarı bulunan ilk mutasyondur. R175Q otozomal dominant FSGS'li hastalarda büyük olasılıkla sorumlu mutasyondur. N ve C uçlarda oluşan mutasyonlar daha fazla duyarlı olduğu bilinmektedir. p.Arg175Gln mutasyon hücre yüzey ekspresyonunda artım gözlenmemiştir.

2011 senesinde Gigante M. ve ark. İtalyan popülasyonunda çalışma yapmışlar. Çalışma grubuna 33 erken başlangıçlı SDNS'li ve geç başlangıçlı otozomal dominant FSGS'li İtalyan hasta dahil edilmiştir. Çalışma sonucunda 3 heterozigot missense mutasyon (c.374A>G_p.N125S, c.653A>T_p.H218L, c.2684G>T_p.R895L) tanımlanmıştır. Bu mutasyonlarla beraber ayrıca 11 hastada P15S ve A404V polimorfizmleri de bulunmuştur. (Gigante et., al., 2011)

N125S mutasyonu, 4 ve 14 yaşlı 2 nefrotik sendromlu hastada izlenmiştir. 374. nükleotide A>G değişimi sonrasında oluşan bir missense mutasyon olarak tanımlanmıştır. Bu mutasyon aynı zamanda İspanyol hasta grubunda da izlenmiştir. Hidrofilik asparajin hidrofilik serin amino asitle yer değişmiştir. TRPC6 proteininin N terminal ucunda bulunmaktadır ve birinci ankirin tekrarıdır. Protein fonksiyonunda nontolerant değişim göstermektedir. Yaptıkları çalışma sonucunda bu mutasyonun varlığı yüksek olasılıklı patojenik durumdur. (Gigante et.al., 2011)

H218L mutasyonu, İtalyan grubunun tanımladığı 2. mutasyondur (Gigante et.al., 2011). 653. nükleotide A>T değişimi sonrasında oluşan bir missense mutasyondur. TRPC6 proteininin N terminal ucunda bulunmaktadır ve dördüncü ankirin tekrarıdır. Hidrofilik histidin hidrofobik histidin amino asitle yer değişmiştir. Bu yer değişimiyle oluşan mutasyon da ilk kez izlenmiştir. Bu mutasyon 8 yaşından beri steroid dirençli nefrotik sendrom hastası olan 18 yaşlı

erişkin oğlan çocukta bulunmuştur. Renal biyopsi sonucunda bu hastada podosit ayakcıklarında silinme gözlemlenmiştir.

R895L mutasyonu, İtalyan grubunun tanımladığı 3. mutasyondur. 13. ekzon 2684. nükleotitte G>T değişimi sonrasında oluşan bir missense mutasyondur (Gigante et.al., 2011). TRPC6 proteinin C terminal ucunda bulunmaktadır. Guanin timin amino asitiyle yer değişmiştir. Bu yer değişimiyle oluşan mutasyon da ilk kez izlenmiştir. Bu mutasyon 1 yaşından beri steroid dirençli nefrotik sendrom hastası oğlan çocukta bulunmuştur. R895L mutasyonu R895C, E897K ve Q889K mutasyonlar gibi karboksilin terminel ucunda yerleştiğinden burdaki mutasyonla protein ekspresyonunu ve Ca²⁺ artışı hızlandırmaktadır.

R895L ve H218L mutasyonları podosit kalsiyum girişini yüksek düzeyde bozmaktadır. Bu da FSGS 2'ye neden olmaktadır.

2011 senesinde Obeidová L. ve ark. Grubu tarafından Pragdaki Charles Üniversitesin'de erişkinlerde TRPC6 değişimleri ile ilgili bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışma grupuna 64 FSGS'li hasta (30 erkek, 34 kadın) dahil edilmiştir. Çalışma 2 sene sürmüştür. 64 hastanın 31-i steroid dirençli, 33 hasta ise steroid duyarlı hastalardan oluşmuştur. Yapılan genetik analizler sonucunda hiç bir mutasyona rastlanmamıştır. Fakat 2 SNP polimorfizmi p.P15S, c.43C>T ve p.A404V, c.1211C>T tanımlanmıştır.

A404V polimorfizmi, SDNS hastalarda %22.9, SSNS hastalarda %29.4 oranla bulunmaktadır. P15S polimorfizmi ise SSNS lu hastalarla kıyaslamada SDNS hastalarda daha çok tanımlanmıştır. (%29 SDNS, %12.1 SSNS). Bu polimorfizimlerle beraber 1 hastada T296T, 36 hastada N561N, 1 hastada Y705Y, 1 hastada T714T, 16 hastada F843F ve 48 hastada Q904Q polimorfizimleri tespit edilmiştir. Fakat bunların hiç biri hastalığa sebebiyet vermemiştir.

Yapılan uzun süreli çalışma sonucunda hiç bir hastalığa sebep olan mutasyon bulunmamıştır. Ancak 43C>T polimorfizmin FSGS hastalarında olası etkisini öğrenmek için daha büyük bir kalabalık hasta populyasyonunda araştırma yapılması öngörülmüştür (Obeidova et. al., 2011).

Q889K mutasyonu, ilk kez Zhu B. ve ark tarafından 2008 senesinde yaptıkları çalışmayla tanımlanmıştır. Çalışmaya 1997-2007 yılları arasında 106 aileden 31 ailesel FSGS öyküsü olan çin aileleri dahil edilmiştir. 2664. nukleotidde C>A değişimi tespit edilmiştir. TRPC6 proteinin sitoplazmatik C terminelinde yer almaktadır. Hidrofilik glutamin hidrofilik lizin amino asitle yer değişimi yapmıştır. (Zhu et., al., 2009)

L395A mutasyonu, ilk defa 2011 senesinde Mir ve ark. tarafından 395. nukleotitte A>T değişimi sonrasında oluşan bir missense mutasyonu olarak tanımlanmıştır. Araştırma grupuna 25 SDNS hastalar dahil edilmiştir. Bunlardan 9-u ailesel, 16-sı ise sporadik SDNS hastalar idi. Kontrol guroru olarak da 50 sağlıklı türk hastalar seçilmiştir. 9 hastada (4 ailesel, 5 sporadik) hiç bir mutasyona rastlanmamıştır. L395A mutasyonu sadece 1 hastada, intornik nukleotid değişimi (c.171 + 16 A>G and c.171+ 86G>C) , 6 hastada ve missense amino asid değişimi (A404V ve N561N) 9 hastada tanımlanmıştır. Bu polimorfizmler 5 ailesel ve 11 sporadik hasta grupunda gözlemlenmiştir. Belirtilen polimorfizmler DNA varyasyonları veritabanında daha önce tanımlanmış olduğundan dolayı patolojik olmadığı düşünülüyor. A404V ve N561N aynı zamanda c.171 +16 A>G; c.171 +86 G>C polimorfizmler seçilmiş olan 50 sağlıklı grupta da izlenmiştir. (Mir S.et.al., 2011)

L395A mutasyonu TRPC6'nın sitoplazmik N-terminal intraselular kuyrugunda yer almaktadır ve bu da protein protein etkileşiminde rol oynamaktadır. Bu mutasyonda hidrofobik Lösin amino asiti hidrofobik Alanin amino asitine yer değişmiştir.

TRPC6'da bu yeni L395A mutasyonu hem ailesel hem de sporadik

hastaların patogenizinde önemli rola sahiptir. Sonuç olarak, hastalığa neden olan bu mutasyonların analizi FSGS patogenezinde yeni anlayışlar sağlayacaktır.

Türkiye ve dünya çapındaki yapılan çalışmaları göz önünde bulundurarak doktora çalışmamda, proteinüri ile seyr edilen hastalıklardan olan nefrotik sendrom etyopatogenezinin açıklık getirmek ve moleküler alt gruplarını saptamak için podosit TRPY proteinlerini kodlayan genlerden TRPC6 gen mutasyon analizini yapmak ve ayrıca yapılan tedavi protokollerini kontrol etmek amaçlanmıştır. Buna istinaden Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Hastalıkları Anabilim Dalı pediatrik Nefroloji Bilim dalında izlenen ve ya Moleküler Tıp Laboratuvarına başka merkezlerden Podosit analizi için gönderilen SDNS ön tanılı 50 hasta ve 25 sağlıklı kişi çalışma grubunu oluşturulmuştur. SDNS ön tanılı 50 hastanın 29 kadın 21'i erkek bireyden oluşmaktadır.

Yapılan çalışmamız sonucunda hastalıkla ilişkisi bilinmeyen ve proteini nasıl etkilediği bilmediğimiz DNA varyantları saptanmıştır. Çalışma sonucunda bazı polimorfizmler tanımlanmıştır. Polimorfizmin etkisi, o polimorfizmin yerleşimine bağlıdır. Genin kodlanan bölgesinde yani ekzonunda oluşan farklılıklar protein dizisini etkileyebileceğinden proteinin yapısı ve fonksiyonu değişebilir. Ayrıca proteini kodlayan bölgelerin dışında, genin sonundaki düzenleyici bölgede veya intronik dizilerde de nükleotid değişiklikleri görülebilir.

Çalışmamızda, TRPC6 ile ilişkili bulunan nükleotid değişimlere göre Ala404Val (8 olgu), Asn561Asn (16 olgu), Pro15Ser (12 olgu), Phe843Phe (2 olgu), c171+20a/g ,c171+86 g/c (30 olgu) ve 3' UTR+552 T>G (6 olgu) olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak TRPC6 proteininin SD'daki rolü ve özellikle SD'da yer alan diğer proteinler ve podosit hücre iskeletini oluşturan proteinlerle etkileşimi ve bu veriler göz önüne alındığında ilk NS kliniği ile gelen çocukta hızlı bir şekilde

TRPC6 gen mutasyon analizi yapılarak hastanın tedavi ve prognozu hakkında bilgi edinilip hastanın yönetilmesi gerektiği kanısındayız.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abdurrahman, M.B., Aikhionbare, H.A., Babaoye, F.A., Sathiakumar, N. and Narayana, P.T., 1990, Clinicopathological features of childhood nephrotic syndrome in Northern Nigeria, *Q J Med*, 75: 563-576.

Arneil, G.C., 1971, The nephrotic syndrome, *Pediatr Clin North Am*, 18:547-559.

Barratt, T.M., 1998, Congenital nephrotic syndrome. In: Davison A, Cameron JS, Grünfeld JP, Kerr DN, Ritz E, Winearls CG (eds), *Oxford Textbook of Clinical Nephrology* (2nd ed), Oxford Medical Publications, New York, pp. 2450-2455.

Benzing, T., 2004, Signaling at the slit diaphragm, *JAm Soc Nephrol*, 15:1382-1391.

Bonilla F.M., Parra C. and Dajani T., 1999, Changing patterns in the histopathology of idiopathic nephrotic syndrome in children, *Kidney Int*, 55: 1885-1890.

Brodehl, J., Krohn, H.P. and Ehrich, J.H., 1982, The treatment of minimal change nephrotic syndrome (lipoid nephrosis): cooperative studies of the Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie (APN), *Klin Padiatr*, 194: 162165.

Bustin, S.A. and Dorudi, S., 1998, Molecular assessment of tumour stage and disease recurrence using PCR-based assays, *Mol Med Today*, 4(9):389-96.

Camici, M., 2007, Urinary detection of podocyte injury, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61, 245 - 249.

Candiano, G., Musante, L. and Zennaro, C., 2001, Inhibition of renal permeability towards albumin: a new function of apolipoproteins with possible pathogenetic relevance in focal glomerulosclerosis, *Electrophoresis*, 22: 1819-1825.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Caridi, G., Trivelli, A., Sanna-Cherchi, S., Perfumo, F. and Ghiggeri, G.M.,** 2010, Familial forms of nephrotic syndrome, *Pediatr nephrol*, 25: 241-252.
- Chaplin, B.E., Rasmussen, R.P., Bernard, P.S. and Wittwer, C.T.,** 1999, LightCycler™ hybridization probes the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection, *Biochemical*; 1:5-8.
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., Strubing, C.,** 2001, The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 387-396.
- Dandapani, S.V., Sugimoto, H. and Matthews, B.D.,** 2007, Alpha-actinin-4 is required for normal podocyte adhesion, *J Biol Chem*, 282: 467-477.
- Eddy, A.A. and Symons, J.M.,** 2003 Nephrotic Syndrome in Childhood, *Lancet*, 362:629-639.
- Fuchshuber, A., Jean, G., Gribouval, O., Gubler, M.C.,** 1995, Mapping a gene (SRN1) to chromosome 1q25-q31 in idiopathic nephrotic syndrome Confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis, *Hum Mol-Genet*, 4: 2155-2158.
- Gbadegesin, R. and Smoyer, W.E.,** 2008, Nephrotic syndrome, In *geary Schaefer D.F., (eds)., Comprehensive Pediatric Nephrology*, 1st ed.; p: 205-213.
- Ghossein, R.A. and Rosai, J.,** 1996, Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells, *Cancer*, 78: 10-16.
- Gigante, M., Caridi, G., Montemurno, E., Soccio, M., D'Apolito, M., Cerullo, G., Aucella, F., Schirinzi, A., Emma, F., Massella, L., Messina, G., De Palo, T., Ranieri, E., Ghiggeri, G. M., Gesualdo, L.,** 2011, TRPC6 mutations in children with steroid-resistant nephrotic syndrome and atypical phenotype. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 6, 1626

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Gut, M., Leutenegger, C.M., Huder, J.B., Pedersen, N.C. and Lutz, H.,** 1999, One-tube fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses, *J Virol Methods*, 77: 37-46.
- Habashy, D., Hodson, E.M. and Craig, J.C.,** 2003, Interventions for steroid-resistant nephrotic syndrome: a systematic review, *Pediatr Nephrol*, 18: 906-912.
- Hill, W.E.,** 1996, The polymerase chain reaction; application for the detection of foodborne pathogens, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36: 23-173.
- Hodson, E.M., Habashy, D. and Craig, J.C.,** April 19. 2004, Interventions for idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome in children, *Cochrane Database of Systematic Reviews* Apr 19(2): CD003594.
- Hofstra JM, Lainez S, van Kuijk WH, Schoots J, Baltissen MP, Hoefsloot LH, Knoers NV, Berden JH, Bindels RJ, van der Vlag J, Hoenderop JG, Wetzels JF, Nijenhuis T.,** 2013, New TRPC6 gain-of-function mutation in a non-consanguineous Dutch family with late-onset focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*.
- International study of kidney disease in children,** 1981, Primary nephrotic syndrome in children: Clinical significance of histopathologic variants of minimal change and of diffuse mesangial hypercellularity: A report of the International Study of Kidney Disease In Children. *Kidney Int*, 20: 765-771.
- Kaplan, J.M., Kim, S.H. and Nort, K.N.,** 2000, Mutation in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis, *Nat Genet*, 24: 251-255.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

Kawachi, H., Miyauchi, N., Suzuki, K., Han, G.D., Orikasa, M. and Shimizu, F., 2006, Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier, *Nephrology* (Carlton); 11: 274-281.

Kevin D. McBryde, M.D, David B. Kershaw, M.D, and William E. Smoyer, M.D, 2001, Pediatric Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome, *Curr Probl Pediatr*; 31:275307.

Khoshnoodi, J. and Tryggvason, K., 2001, Congenital nephrotic syndromes, *Curr Opin Genet Dev*; 11:322-327.

Kim, J.M., Wu, H. and Green, G., 2003, CD2- associated protein haploinsufficient is linked to glomerular disease susceptibility, *Science*; 300: 1298-1300.

Kim, J.S., Bellew, CA., Silverstein, D.M., Aviles, D.H, Boineau, F.G. and Vehaskari, V.M., 2005, High incidence of initial and late steroid resistance in childhood nephrotic syndrome, *Kidney Int*, 68: 1275-1281.

Kitamura, A., Tsukaguchi, H. and Hiamoto, R., 2007, A familial childhood-onset relapsing nephrotic syndrome, *Kidney Int*, 71: 946-951.

Kitano, Y., Yoshikawa, N. and Nakamura, H., 1993, Glomerular anionic sites in minimal change nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis, *Clin Nephrol*, 40:199-204.

Klug, S.W., Cummings, W.R., 2000, *Concept of Genetics*, Prentice Hall, New Jersey 745 p..

Koop, K., Eikmans, M., Baelde, H., Kawachi, H., Deheer, E., Paul, L. and Bruijn, J., 2003, Expression of Podocyte-Associated Molecules in Acquired Human Kidney Diseases. *J Am Soc Nephrol*, 14:2063-2071.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

Kubista, M., Andrade, J.M., Bentsson, M., Forootan, A., Jonak, J. and Lind, K., 2006, The Real-Time PCR, *Mol Aspects Med*, 27: 95-125.

Kubista, M., Stalberg, A. and Bar, T., 2001, Light-up probe based real time q-PCR, *Genomics and Proteomics Technologies*, 1st ed., *Proceedings of SPIE*, 53-8.

Lee, L.G., Connell, C.R. and Bloch, W., 1993, Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes, *Nucleic Acids Res*, 11;21(16):3761-6.

Lowik, M.M., Groenen, P.J. and Pronk, I., 2007, Focal segmental glomerulosclerosis in a patient homozygous for a CD2AP mutation, *Kidney Int*, 72: 1198-1203.

Machua E., Benoit G. And Antignac C., 2009, Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology, *Human Molecular Genetics*, Vol. 18, Review Issue 2

Matovinović M.S., 2009, Podocyte injury in glomerular diseases, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 20-01

Maxam, A., Gilbert, W. 1977, A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 560-4

McBryde, K.D., Kershaw, D.B. and Smoyer, W.E., 2001, Pediatric steroid resistant nephrotic syndrome, *Curr Probl Pediatr*, 31: 275-307.

McPherson, M.J. and Möller, S.C., 2000, PCR, *Heredity*, 86: 513-514.

Möller C. C., Flesche J. and Reiser J., 2009, Sensitizing the Slit Diaphragm with TRPC6 Ion Channels. *Nephrol* 20, 950-953

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Mukerji, N., D amodaran, T. V., Winn, M. P.,** 2007, TRPC6 and FSGS: the latest TRP channelopathy. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 859-868.
- Mundel, P. and Shankland, S.J.,** 2002, Podocyte biology and response to injury, *J AmSoc Nephrol*, 13:3005-3015.
- Mir, S., Yavascan, O., Berdeli, A., Sozeri, B.,** 2012, TRPC6 gene variant in Turkish children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nephrol. Dial. Transplant.* 27, 205-209.
- Niaudet, P.,** 1994, Treatment of childhood steroid resistant idiopathic nephrosis with a combination of cyclosporine and prednisone, *French Society of Pediatric Nephrology, J Pediatri*, 125: 981-986.
- Nordgard, O., Kvaloy, J.T., Farnen, K.R. and Heikkila, R.,** 2006, Error propagation in relative real-time reverse transcription polymerase chain reaction quantification models: The balance between accuracy and precision, *Analytical Biochemistry*, 356 (2): 182-193
- Obeidová. L., Reiterová, J., Lněnička P., Štekrová J., Šafránková H., Kohoutová M. , Tesař V.** 2012, TRPC6 Gene Variants in Czech Adult Patients with Focal Segmental Glomerulosclerosis and Minimal Change Disease, *Folia Biol (Praha)*, 58(4):173-6.
- Özçakar, B.Z., Yalçınkaya, F. ve Ekim, M.,** 2004, Inherited Podocyte Diseases, *Nefroloji Dergisi*; 13 (3) 125-129.
- Perkin E.,** ABI 310 Genetic Analyzer Manuel, 2000

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Pollak, M.R.**, 2003, The genetic basis of FSGS and steroid resistant nephrosis, *Seminars InNephrology*, 23:141-146.
- Radice, G.L., Ferreira-Cornwell, M.C. and Robinson, S.D.**, 1997, Precocious mammary gland development in P- cadherin-deficient mice, *J Cell Biol*, 139: 10251032.
- Ramachandran, C. and Melnick, S.J.**, 1999, Multidrug resistance in human tumors-molecular diagnosis and clinical significance, *Mol Diagn*, 4(2):81-94.
- Reiser, J., Polu, K. R., Möller, C. C., Kenlan, P., Altintas, M. M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Avila-Casado, C., McGee, M., Sugimoto, H., Brown, D., Kalluri, R., Mundel, P., Smith, P. L., Clapham, D. E., Pollak, M. R.**, 2005, TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nature Genet.* 37, 739-744.
- Rodewald, R. and Karnovsky, M.J.**, 1974, Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and Mouse, *J Cell Biology*, 60: 423-433.
- Reiser, J., Polu, K.R. and Moller, C.C.**, 2007, TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function, *J Am Soc Nephrol*, 18: 2936
- Sambrook, J. Fritsch, E.F., Maniatis, T.** 1989 *Molecular Cloning, a laboratory manual.* Cold spring harbor laboratory Press New York
- Santín, S., Ars, E., Rossetti, S., Salido, E., Silva, I., García-Maset, R., Giménez, I., Ruíz, P., Mendizábal, S., Luciano Nieto, J., Peña, A., Camacho, J. A., Fraga, G., Cobo, M. A., Bernis, C., Ortiz, A., de Pablos, A. L., Sánchez-Moreno, A., Pintos, G., Mirapeix, E., Fernández-Llama, P., Ballarín, J., Torra, R., Zamora, I., López-Hellin, J., Madrid, A., Ventura, C., Vilalta, R., Espinosa, L., García, C., Melgosa, M., Navarro, M., Giménez, A., Cots, J. V.,**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

Alexandra, S., Caramelo, C., Egado, J., San José, M. D. M., de la Cerda, F., Sala, P., Raspall, F., Vila, A., Daza, A. M., Vázquez, M., Ecija, J. L., Espinosa, M., Justa, M. L., Poveda, R., Aparicio, C., Rosell, J., Muley, R., Montenegro, J., González, D., Hidalgo, E., de Frutos, D. B., Trillo, E., Gracia, S., de los Ríos, F. J. G., 2009, TRPC6 mutational analysis in a large cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 24, 3089-3096

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-7.

Saskia F. H., Clemens C. M., Jianyang D., Lixia Y., Bernward H., Gil C., Christopher N. V., Peter F. H., Jochen R. and Friedhelm H., 2009, A Novel TRPC6 Mutation That Causes Childhood FSGS, *PLoS ONE* 4(11): e7771

Schmid, H., Henger, A., Cohen, C.D., Frach, K., Grone, H., Schlondorff, D. and Kretzler, M., 2003, Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases, *J Am Soc Nephrol*, 14:29582966.

Schwarz, K., Simons, M. and Reiser, J., 2001, Podocin, a raft- associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin, *J Clin Invest*, 108: 1583-1587.

Shalhoub, R.J., 1974, Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder to T-cell function. *Lancet*; 2: 556-560.

Sharples, P.M., Poulton, J. and White, R.H., 1985, Steroid responsive nephrotic syndrome is more common in Asians, *Arch Dis Child*, 60: 1014-1017.

Shih, N.Y., Li, J. and Karpitski, V., 1999, Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein, *Science*, 286: 312-315.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Kalman, S.**, 2004, Çocukluk çağında steroid dirençli nefrotik sendromda önemli bir neden olan fokal segmental glomerülosklerozda tedavi yaklaşımları, *Gülhane Tıp Dergisi*, 46 (2): 183 - 188.
- Tyogi, S. and Kramer, F.R.**, 1996, Molecular beacon: probes that fluoresce upon hybridization, *Nat. Biotechnology*, 14, 303- 308.
- Van Der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J. and Van Dongen, J.J.**, 2003, Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR, *Leukemia*; 17: (10)13-34.
- Weber, S.**, 2008, Hereditary nephrotic syndrome. In Geary DF, Schaefer F (eds). *Comprehensive Pediatric Nephrology*. 1st ed., p: 219-228.
- Weins, A., Kenlan, P. and Herbert, S.**, 2005, Mutational and biological analysis of alpha-actinin-4 in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*, 16: 3694-3701.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P.**, 1997, Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification, *Biotechniques*, 22: 130-1, 134-8.
- Winn, M. P., Conlon, P. J., Lynn, K. L., Farrington, M. K., Creazzo, T., Hawkins, A. F., Daskalakis, N., Kwan, S. Y., Ebersviller, S., Burchette, J. L., Pericak-Vance, M. A., Howell, D. N., Vance, J. M., Rosenberg, P. B.**, 2005, A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308, 1801-1804.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

Winn MP, Daskalakis N, Spurney RF et al., 2006, Unexpected role of TRPC6 channel in familial nephrotic syndrome: does it have clinical implications? *J Am Soc Nephrol*; 17: 378–387

Yuan, H., Takeuchi, E., Taylor, G.A., McLaughlin, M., Brown, D. and Salant, D.J.,2002, Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. *Am J Physiol*, 282: 585-591.

Zenker, M., Machuca, E. and Antignac, C, 2009, Genetics of nephrotic syndrome: new insights into molecules acting at the glomerular filtration barrier. *JMol Med* 2009, 87: 849-857.

Zhu, B., Chen, N., Wang, Z. H., Pan, X. X., Ren, H., Zhang, W., Wang, W. M. 2009, Identification and functional analysis of a novel TRPC6 mutation associated with late onset familial focal segmental glomerulosclerosis in Chinese patients. *Mutat. Res.* 664, 84-90.

ÖZGEÇMİŞ**Günel ALİZADA****Telefon:** +90 (533) 023 19 82**Adres :** Kazim Dirik Mah. 190 sok no 12 daire 16 Bornova, İzmir / TÜRKİYE**E-mail :** alizadegunel@gmail.com**Doğum Tarihi :** 14.03.1985**Doğum Yeri :** Bakü / AZERBAYCAN**Uyruğu:** Azerbaycan**Medeni Durumu :** Bekar**Eğitim Bilgileri :**

2008 – 2013	<u>Doktora</u> Ege Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Podositopatilerden Nefrotik Sendromdaki Proteinüri ile Podosit Genlerinin Mutasyon ve Ekspresyon İlişkisi
86/100	Prof.Dr.Sabire KARAÇALI ve Prof.Dr.Afig BERDELİ
2005 – 2007	<u>Yüksek Lisans</u> Bakü Devlet Üniversitesi Genetik
5 / 5	Dissertation : ‘‘Farklıploidi dut bitkilerinin kuraklık stresine devamlılık derecesinin tayini ve genetik sistemde baş vermiş değişikliklerin öyrenilmesi’’ Prof.Dr. Ellada AKHUNDOVA
2001 – 2005	<u>Lisans</u> Bakü Devlet Üniversitesi Biyoloji
4.3 / 5	

Araştırma Alanları:

DNA İzolasyon

Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA Sequencing

Projede Yaptığı Görev:

“Podositopatilerden Nefrotik Sendromdaki Proteinüri ile Podosit Genlerinin Mutasyon ve Ekspresyon İlişkisi” Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi 03/2012

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

Morus L. Türünde Ploidliğin Artmasıyla İlişkili DNA Fraksiyonlarının Değişmesi, E.M.AKHUNDOVA, G.İ.ALİZADA, N.S.KALANTAROVA, Ş.U.HACIYEVA, Bakü Devlet Üniversitesi AMEA Genetik Enstitüsü, “Uygulamalı Biolojinin Problemleri” konusunda Devlet Bilimsel Konferansın Materiaları 2007

“Dut Bitkisinin Azploidli Tür ve Cinslerinde DNA Yapısının Özellikleri” G.İ.ALİZADA Bakü Devlet Üniversitesi, AMEA Genetik Enstitüsü, “Uygulamalı Biolojinin Problemleri “ konusunda Devlet Bilimsel Konferansın Materiaları 2007

Sertifikalar

Discussion Meeting on Siloglycobiology 26-27 Kasım 2011
Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji AD. – Ebiltem & Tubitak Desteği ile

Kanser Biyolojisi ve İmmunolojisi Kursu 29-30 Mart 2012
Ege Üniversitesi & Kanserle Savaş Araştırma Uyg.Merkezi

Kanser Biyoloji ve Genetiği Sempezyumu 31 Mart 2013
Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Topluluğu (EBİLTET) ve Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM)

The 2nd International Students’ Stem Cell Congress 24-25-26 May 2013
Hücre Tedavi ve Rejeneratif Tıp Derneği, Türk Kök ve Ege Üniversitesi

‘‘Örnek Hekim Olmaya Doğru2’’ Azerbaycanlı Genç Hekimlerin ve Tıp Eğitimi Alan Öğrencilerin İkinci Türkiye Formu

3-4 Kasım 2012

Teşekkürname

‘‘Örnek Hekim Olmaya Doğru2’’ Azerbaycanlı Genç Hekimlerin ve Tıp Eğitimi Alan Öğrencilerin İkinci Türkiye Formu Teşkilat Üyesi

3-4 Kasım 2012

Yabancı Dil

Azerbaycanca

Türkçe

İngilizce

Rusca

Bilgisayar Becerileri:

MS Office Programları (Etkin), Finch TV, SPSS, Fax, Fotokopi

Hobiler

Yüzme, Piyano Çalmak, Kitap Okumak

EKLER

EK 1



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
 Tel:0 232 390 4219 - 373 78 81 Fax: 0232 390 21 34
 e-mail: aetikk@mail.ege.edu.tr www.aek.med.ege.edu.tr



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	-				
	PROTOKOL ADI	Podositopatilerden Nefrotik Sendromdaki Proteinüri ile Podosit Genlerinin Mutasyon ve Ekspresyon İlişkisi.				
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI/ ADI	Prof. Dr. Afif BERDELİ				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	EÜTF. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD				
	DESTEKLEYİCİ FIRMA	-				
FAZİ	İlaç Dışı					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi / Değişiklik No. Su		Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	23.06.2011		Türkçe		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU	02.08.2011		Türkçe		
OLGU RAPOR FORMU	-		Türkçe			
KARAR BİLGİLERİ	Kararı No	11-7/16				
	Tarih	28.09.2011				
Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş; adı geçen araştırmaya araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda etik açıdan sakınca olmadığına ve Ege Üniversitesi Senatosu tarafından 26.10.2010 tarihinde onaylanan ve yürürlüğe giren Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Yönergesi gereğince Kurulumuz kararının Sağlık Bakanlığı'na iletilerek Bakanlık izni sonrası çalışmaya başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.						
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Yönergesi, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kaan KAVAKLI Başkan	Çocuk Sağlığı Hst. ve Çocuk Kan Hst	E.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hst. AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Aytül ÖNAL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Suna TOKSAVUL Üye	Protetik Diş Tedavisi	E.Ü. Diş Hek. Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Hayriye ELBİ Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Bülent SEMERCİ Üye	Üroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Zeliha KERRY Üye	Farmakoloji	EÜ. Eczacılık Fakültesi AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Süheyla ALTUĞ ÖZSOY Üye	Halk Sağlığı Hemşireliği	EÜ. Hemşirelik Yüksek Okulu AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Zeki KARASU Üye	İç Hastalıkları ve Gastroenteroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Osman ZEKİOĞLU Üye	Patoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Yasemin AKÇAY Üye	Tıbbi Biyokimya	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Araştırma Başvurusu Onay Belgesi		ASLI GİBİDİR EUTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı		Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
				15	03.11.2010/04	31/126



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

KARAR BİLGİLERİ		Karar No : 11-7/16				
Doç. Dr. Çağatay ÜSTÜN Üye	Tıp Tarihi ve Etik	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Şafak TANER Üye	Halk Sağlığı	E. Ü. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Ayşe EROL Üye	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Yrd. Doç. Dr. Timur KÖSE Üye	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Av. Özge TÜRKOĞLU Üye	Avukat	EÜ. Döner Sermaye İşletme Müdürlüğü Hukuk Bürosu	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI
Uzm. Ecz. Ebru BEDİR Raportör	Eczacı	E.U. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI
Fatma BÜYÜKAKKUŞ Üye	Ziraat Mühendisi	Emekli	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

- * Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

ASLI GİBİDİR
EÜTF Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı