

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OTOZOMAL RESESİF POLİKİSTİK BÖBREK  
HASTALARINDA PKHD1 GENİNİN 14, 15, 16, 32,  
33, 34, 53, 54, 58 ve 60 NOLU EKZONLARINDAKİ  
MUTASYONLARIN DNA DİZİ ANALİZİ ile  
SAPTANMASI**

**ÖZGÜR BÜLBÜL**

**TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS**

**İZMİR- 2009**

T.C  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OTOZOMAL RESESİF POLİKİSTİK BÖBREK  
HASTALARINDA PKHD1 GENİNİN 14, 15, 16, 32,  
33, 34, 53, 54, 58 ve 60 NOLU EKZONLARINDAKİ  
MUTASYONLARIN DNA DİZİ ANALİZİ ile  
SAPTANMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ÖZGÜR BÜLBÜL**

Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Şube Müdürlüğü tarafından proje no 2007.KB. SAG.  
009 ile desteklenmiştir.

Sağladıkları tüm imkanlardan dolayı Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğüne,

Sundukları tüm olanaklar, kolaylıklar ve yardımları için başta enstitü müdürümüz Prof. Dr. Gül Güner olmak üzere tüm Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Sağladığı laboratuvar imkanları ve desteği için Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Neşe Atabey'e,

Tez projesinin oluşturulmasında, laboratuvar aşamasında ve tezin yazılması aşamalarındaki katkıları, bilimsel desteği ve bana olan inancından, güveninden ötürü tez danışmanım Prof. Dr. Orhan Terzioğlu'na,

Bilimsel ve manevi destekleri için Doktora öğrencisi Yalın Kılıç'a, Ar. Gör. Özlenen Şimşek'e, Doktora Öğrencisi Melek Pehlivan'a, Ar. Gör. Murat Çokaklı'ya ve arkadaşım Mehmet Perdeci'ye,

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü desteği esirgemeyen aileme,

Ve emeği geçen herkese sonsuz teşekkür ederim...

Özgür Bülbül

İÇİNDEKİLER	I
Tabloların listesi	III
Şekillerin listesi	IV
Kısaltmalar ve Tanımlamalar	V
Özet(Türkçe)	1
Özet(İngilizce)	2
Giriş ve amaç	3
<b>1.GENEL BİLGİLER</b>	<b>7</b>
1.1 Kalıtsal Polikistik Böbrek Hastalıkları	7
1.1.1 Otozomal Dominant Polikistik Böbrek Hastalığı	7
1.1.1.1 PKD1 Geninin Yapısı ve Kodladığı Protein	8
1.1.1.2 PKD2 Geninin Yapısı ve Kodladığı Protein	8
1.1.2 Otozomal Resesif Polikistik Böbrek Hastalığı	9
1.1.2.1 PKHD1 Geninin Yapısı ve Kodladığı Proteini	12
1.1.2.2 Tanı Kriterleri	14
1.1.2.3 PKHD1 Geninde Gözlenen Mutasyonlar	15
1.1.2.4 Genotip-Fenotip Korelasyonu	20
1.1.2.5 ORPBH'nın Prenatal Tanısı	21
1.1.2.6 Kist Oluşumu ve Sinyal Yolakları	21
<b>2.GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	<b>24</b>
2.1 Örnek Alımı, Çalışma Grubunun Oluşturulması	25
2.2 Kan örneklerinden DNA eldesi	25
2.2.1 Stok çözeltiler ve hazırlanışları	25
2.2.2 Kullanıma hazır kimyasalar	27
2.2.3 Hasta Örneklerinde Kullanılan Numaralandırma Sistemi	27
2.2.4 Manuel DNA İzolasyonunda Uygulanan Protokol	28
2.2.5 DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi	30
2.3 $\beta$ -Actin Geninin ve PKHD1 Geninin 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60 Nolu Ekzonlarının PCR ile Çoğaltılması	30
2.3.1 Ondört Nolu Ekzonun Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri	31
2.3.2 Onbeş Nolu Ekzonun Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri	31

2.3.3 Onaltı Nolu Ekzonun Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri	31
2.3.4 Otuz İki Nolu Ekzonun Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri	32
2.3.5 Otuz Üç Nolu Ekzonun Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri	34
2.3.6 Otuz Dört Nolu Ekzonun Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri	35
2.3.7 Elli Üç Nolu Ekzonun Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri	35
2.3.8 Elli Üç Nolu Ekzonun Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri	35
2.3.9 Elli Sekiz Nolu Ekzonun Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri	36
2.3.10 Altmış Nolu Ekzonun Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri	37
2.4 PCR Karışımı ve Hazırlanışı	38
2.4.1 PCR Koşulları	41
2.5 PCR Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jel Elektroforeziyle Kontrol Edilmesi	43
2.5.1 PCR Ürünlerinin Kontrolü ve Fotoğraflanması	44
2.6 DNA Dizi Analizi	44
<b>3.BULGULAR</b>	<b>45</b>
3.1 Otozomal Resesif Polikistik Böbrek Hastalarında PKHD1 Geninin 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60 Nolu Ekzonlarındaki Mutasyonların DNA Dizi Analizi İle Taranması ve Saptanan Değişimler	46
3.1.1 Kan Örneklerinden DNA Eldesi	46
3.2 PCR Ürünlerinin Kontrolüne Ait Bulgular	47
3.3 PKHD1 Genininin 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60 nolu Ekzonlarında Gözlenen Değişimler	48
3.4. PKHD1 Genininin 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60 nolu Ekzonlarında Sekansların Eldesi	51
<b>4.TARTIŞMA</b>	<b>96</b>
<b>5.EKLER</b>	<b>101</b>
<b>6.KAYNAKLAR</b>	<b>108</b>

## TABLO LİSTESİ

Tablo1.1 PKHD1 geninde 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60 nolu ekzonlarında litaretürde tanımlı mutasyonlar	15
Tablo 1. 2 Türk hastalarda gözlenen mutasyonlar	19
Tablo 2. 1 Primerlerin ve PCR ürünlerinin büyüklükleri	38
Tablo 2. 2: Ekzon 16, 32C'nin PCR karışım miktarlarının gösterimi	40
Tablo 2.3 : Ekzon 14, 15, 32A, 32B, 32E, 32G, 33, 53, 54, 58A, 58B, 58C, 58D, 60'ın PCR karışım miktarlarının gösterimi.	40
Tablo 2.4 : Ekzon 32D, 32F ve 34'ün PCR karışım miktarlarının gösterimi	41
Tablo 2. 4: $\beta$ -Actin geninin PCR profili	41
Tablo 2.5: Ekzon 14, 15, 16, 32A, 32B, 32D, 32E, 32F ve 32G'nin PCR profili	42
Tablo 2.6: PKHD1 geninin 33, 34, 53, 54, 58A, 58B, 58C, 58D, 60 nolu ekzonlarının PCR profili	42
Tablo 2. 7: PKHD1 geninin 32C nolu ekzonlarının PCR profili	43

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1 Polikistin-1 ve Polikistin-2 protein yapılarının şematik olarak gösterimi	9
Şekil 1. 2 Polikistik böbrek hastalığında böbreğin renal patolojisi	10
Şekil 1. 3 PKHD1 geninin kromozomdaki yerleşimi	12
Şekil 1. 4 Fibrokistin/ polidaktin (FK) gen yapısının şematik görünümü	13
Şekil 1. 5 Yabanıl tip ve PKD'nin böbrek epitelyal hücrelerinde farklarını şematik olarak karşılaştırılması	22
Şekil 1. 6 PKD'de sinyal yolları	23
Şekil 3. 1.1 DNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü	47
Şekil 3. 2.1 $\beta$ -actin (internal kontrol) PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	48
Şekil 3. 3.1 15.ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	48
Şekil 3. 3.2 Ekzon 32A PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	49
Şekil 3. 3.3 34. ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	49
Şekil 3. 3.4 Ekzon 58B PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	50
Şekil 3. 3.5 60. ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	50
Şekil 3. 4. 1 Ekzon 14'te Mutasyon Saptanan Hastaların Sekans Sonuçları	51
Şekil 3. 4. 2: Ekzon 15'te saptanan SNP sonuçları	51
Şekil 3. 4. 3 Ekzon 16'da mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları	69
Şekil 3. 4. 4 Ekzon 32A da saptanan değişimler	70
Şekil 3. 4. 5: Ekzon 32A'da saptanan SNP sonuçları	71
Şekil 3. 4. 6: Ekzon 32C'de mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları	80
Şekil 3. 4. 7: Ekzon 32E'de mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları	81
Şekil 3. 4. 8 Ekzon 33'te mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları	84
Şekil 3. 4. 9 Ekzon 34'te mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları	84
Şekil 3. 4. 10 Ekzon 53'te mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları	85
Şekil 3. 4. 11: Ekzon 54'te saptanan SNP sonuçları	85
Şekil 3. 4. 12: Ekzon 54'te saptanan mutasyon sonuçları	86
Şekil 3. 4. 13 Ekzon 58A'da mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları	87
Şekil 3. 4. 14: Ekzon 58B'de saptanan SNP sonuçları	88
Şekil 3. 4. 15: Ekzon 58C'de saptanan SNP sonuçları	91
Şekil 3. 4. 16: Ekzon 58D'de mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları	92

## KISALTMALAR

A: Alanin  
aa: Aminoasit  
ABD: Anabilim Dalı  
AC: Adenyl Cyclase  
ADPKD: Autosomal Resesif Polycystic Kidney Disease  
ARPKD: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease  
C: Sistein  
D: Aspartik asit  
del: Delesyon  
dk: Dakika  
DEÜ: Dokuz Eylül Üniversitesi  
DNA: Deoksiribonükleik Asit  
dNTP: Deoksiribonükleotid Trifosfat  
EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik asit  
ESRD: End Stage Kidney Disease  
ER: Endoplazmik Retikulum  
FK: Fibrokistin  
G: Glisin  
µg: Mikrogram  
µl: Mikrolitre  
ml: Mililitre  
mM: Milimolar  
ng: Nanogram  
kb: Kilobaz  
KHF: Konjenital Hepatik Fibroz  
OD: Optik dansite  
ODPBH: Otozomal Resesif Polikistik Böbrek Hastalığı  
ORF: Open Reading Frame  
ORPBH: Otozomal Resesif Polikistik Böbrek Hastalığı  
PBH: Polikistik Böbrek Hastalığı  
PKA: Protein Kinaz A



PKD: Polycytic Kidney Disease  
PKD1: Polycystic Kidney Disease- 1  
PKD2: Polycystic Kidney Disease- 2  
PKD3: Polycystic Kidney Disease- 3  
PK1: Polycystin- 1  
PK2: Polycystin- 2  
PKHD1: Polycytic Kidney and Hepatic Disease- 1  
R:Arjinin  
S: Serin  
SDBY: Son Dönem Böbrek Yetmezliği  
SDS: Sodyum Dodesil Sülfat  
SNP: Single Nucleotid Polymorphism  
TBE: Tris Buffer EDTA  
T.C: Türkiye Cumhuriyeti  
TE: Tris EDTA  
V: Valin  
W:Triptofan  
Y: Trozin

## ÖZET

### **OTOZOMAL RESESİF POLİKİSTİK BÖBREK HASTALARINDA PKHD1 GENİNİN 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58 VE 60 NOLU EKZONLARINDAKİ MUTASYONLARIN DNA DİZİ ANALİZİ İLE SAPTANMASI**

Otozomal resesif polikistik böbrek hastalığı-ORPBH(Autosomal Resesif Polycystic Kidney Disease-ARPKD-MIM263200) böbrek ve karaciğer tutulumu gösteren bir tek gen hastalığıdır. Bu hastalık ile ilişkili gen olan PKHD1 (Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1) kromozom 6p21.1-p12'de yerleşim gösterir. ORPBH, belirtilerin ortaya çıktığı yaşa bağlı olarak perinatal, neonatal, infantil ve juvenil olarak dört gruba ayrılır. Bu dört grupta böbrek ve karaciğerde farklı oranlarda tutulum gözlenirken, neonatal tip hastaların yaklaşık %30-50'si doğumdan kısa bir süre sonra solunum yetmezliğinden ölmektedir. Hastalığın başlıca bulguları, genellikle bilateral yerleşim gösteren böbrek kistleri, böbrek toplama kanallarında ve karaciğerde genişleme, solunum yetmezliği, hipertansiyon ve idrar yolları enfeksiyonlarıdır. Yapılan çalışmalar, ORPBH'nin genel olarak 1:20.000 ile 1:40.000 arasında görüldüğünü, taşıyıcılık sıklığının ise 1: 70 olduğunu göstermektedir.

Yürütülen çalışmada 33 akraba olmayan hastadan ve hayatta olmayan iki hastanın anne ve babasından periferik kan alınarak DNA'ları izole edildi. Bu DNA' lar ile PKHD1 geninin 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58 ve 60 nolu ekzonları PCR (Polymerase Chain Reaction) ile çoğaltıldı. Her bir ekzona ait PCR ürünüde DNA dizi analizi yapıldı, veriler değerlendirilerek gereken durumda çift yön PCR ve tekrar gerçekleştirildi. Dizi verileri değerlendirilerek mutasyon ve SNP'ler saptandı.

PKHD1 genindeki 67 ekzonun 10'unda PCR-dizi analizi sonucu, farklı kurumlardan gönderilen 33 hasta ve 2'ser anne babadan 3'ünde tek, 10'ununda iki ve 1'de üç mutasyon saptandı. Araştırma literatürde tanımlı 10 mutasyona ilaveten 9 tanımlı olmayan yayımlanmamış yeni mutasyon bulunmuştur.

## **SUMMARY**

### **DETERMINING PKHD1 GENE EXON 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58 AND 60 MUTATIONS BY DNA SEQUENCE ANALYSIS IN AUTOSOMAL RECESSIVE POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE PATIENTS**

Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD) is a single gene disorder with kidney and liver involvement. PKHD1 (Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1) gene is related with this disorder and localized on 6p21.1-p12. ARPKD is separated into four groups as perinatal, neonatal, infantile and juvenile, according to the onset age of the signs of the disease. Degree of the renal and hepatic involvement changes among these four groups when 30-50% of the patients die soon after their birth in neonatal group because of respiratory failure. Main signs of the disease are the renal cysts which are usually bilateral, dilatation in collecting ducts and liver, respiratory failure, hypertension and urinary tract infections. In studies, the prevalence of ARPKD is shown to be 1:20.000 to 1:40.000 with a carrier frequency of 1:70.

Study carried out in 33 unrelated patients and non-life mother and father of two patients by taking DNA was isolated from the peripheral blood. By this DNA's the 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58 and 60 numbered of exons of PKHD1 gene were amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction) DNA sequencing analyses was performed each PCR product of exons, the data was evaluated in the necessary condition two sides PCR and repeat was performed. The mutations and SNP's were determined by evaluating the sequencing data.

The PCR-sequencing analyses results at the 10 of 67 exons in the PKHD1 gene, 33 patients sent from different institutions and at 3 of 2 each parents was single, at ten of them were 2 and at one of them was 3 mutations obtained.

## **GİRİŞ VE AMAÇ:**

Polikistik Böbrek Hastalığı-PBH (Polycystic Kidney Disease-PKD) normal böbrek fonksiyonu ve yapısının kaybı ile ilerleyen tübüler kistik genişleme nedeniyle son dönem böbrek yetersizliğine-SDBY (End Stage Renal Disease-ESRD) yol açabilen kalıtsal böbrek hastalığıdır. Otozomal dominant ve otozomal resesif kalıtılmasına ve yaşa bağlı olarak farklı organlarda, farklı şekillerde tutulum görülmektedir.

Otozomal Dominant Polikistik Böbrek Hastalığı -ODPBH (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease-ADPKD; MIM 173900) toplumda 1: 500- 1: 1000 görülme oranı ile sık rastlanan, çoğu organı içeren anormal bağ dokusu ve kistler ile multisistemik genetik bir hastalıktır. Hastalık genetik olarak heterojen olup PKD1 ile PKD2 geni ile ilişkilidir, bu genler sırasıyla 16p13.3 ve 4q21'de yer almaktadır. Avrupa Polikistik Böbrek Hastalıkları Konsorsiyumu'nda (1994), hastalıktan yaklaşık %85 oranında PKD1'in ve %15 oranında ise PKD2 geninin sorumlu olduğu bildirilmiştir. PKD1 geninin büyük bir kısmının %95'den fazla homolojiye sahip en az altı gen bölgesi ile duplike olması nedeniyle mutasyon analizi zorlaşmaktadır. Hastalığın dominant kalıtımının genetik heterojenite göstermesi nedeniyle bu aşamada çalışmaya uygun bulunmamıştır.

Otozomal Resesif Polikistik Böbrek Hastalığı-ORPBH (Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease-ARPKD; MIM263200) böbrek ve karaciğer tutulumu gösteren bir tek gen hastalığıdır. Toplumda taşıyıcılık sıklığı yaklaşık 1: 70, görülme sıklığı 1: 20000- 1: 40000 civarındadır. ORPBH, belirtilerin ortaya çıktığı yaşa, böbrek ve karaciğer tutulumunun ciddiyetine bağlı olarak perinatal, neonatal, infantil ve juvenil olarak dört gruba ayrılır. Hastalığın başlıca klinik bulguları, bilateral -genellikle simetrik- böbrek kistleri, böbrek toplama kanallarında ve karaciğer portal alanda dilatasyon; solunum yetmezliği, hipertansiyon, idrar yolları enfeksiyonlarıdır. Hastalıkla ilişkilendirilen Polycystic Kidney and Hepatic Disease1(PKHD1) geni, kromozom 6p21.1-p12'de bulunur ve fibrokistin/polidaktin proteinini kodlar.

PKHD1 geninde yurt dışındaki farklı merkezlerde saptanan 282 mutasyonu kapsayan veri tabanı 2006 sonunda yayınlandı. Bu veri tabanında yer alan araştırmalarda 45 Türk hastada 22 değişik ekzonda 35 farklı mutasyon bulunduğu görüldü. Bu mutasyonların %66.6' sının 10 farklı ekzonda yer aldığı belirlendi. Araştırmanın yürütüleceği zaman, maliyet ve yarar dikkate alındığında öncelikli olarak PKHD1 geninin 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60 nolu ekzonlarında DNA dizi analizi ile mutasyon saptanması hedeflendi. T.C Sağlık Bakanlığı Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nefroloji Bölümü'nden 12 hasta, T.C Sağlık Bakanlığı Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nefroloji Bölümü'nden 7 hasta ve 1 anne-baba, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Nefroloji Bölümü'nden 6 hasta, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Nefroloji Bölümü'nden 4 hasta 1 anne-baba, Akdeniz Üniversitesi'nden 3 hasta, DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları ve Sağlığı Nefroloji ABD'dan 1 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya alınan tüm hastalara uluslararası ölçütlere uygun olarak tanı konmuştur. Ayrıca, hastalık, önlem, doğum öncesi tanı açısından aydınlatılmaları, klinik bulgularla genotip-fenotip korelasyon tablosunun oluşturulması, tedavi planlamasına katkı ve Türkiye'de daha geniş hasta gruplarında çalışmak üzere standartlara uygun yöntemin kurulması amaçlandı.

ORPBH birçok olguda ölüme sebep olduğu için, hasta çocuğu olan aileler prenatal tanıya yönlendirilmelidir. ORPBH'nin fetal ultrason ile prenatal tanısı gebeliğin 21. haftasından sonra yapılabilir. Fakat hafif belirtiler sergileyen olgularda ultrasonografi ile prenatal tanı imkansız olabilir. Haplotip analizinin çoğu durumda uygulanması mümkündür fakat patoanatomik olarak kesin tanısı olmayan ailelerde yanlış teşhis konulabilmektedir. Güvenilir prenatal tanı yalnızca moleküler genetik analizle mümkündür. Klinik seyri hafif olan hastalarda genellikle missens mutasyonları, ciddi seyri olan hastalarda ise zincir sonlanma mutasyonu daha sık görülür. Mutasyonun bulunduğu yere ve türüne göre hastalığın hafif ya da ağır formda olması nedeniyle, hastalardaki mutasyonların saptanması klinik açıdan çok önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda ilgili ekzonlardaki mutasyonların saptanması ile ebeveynlerin, olası gebeliklerde doğacak olan çocuklarının otozomal resesif polikistik böbrek hastası olma ihtimali göz önünde bulundurularak ailelerin prenatal tanıya yönlendirilmeleri ile hasta çocuk doğumu ve bazı durumlarda ölümün önlenmesi önemlidir. Uluslararası standartlara uygun olarak kurulacak mutasyon tarama ve değerlendirmeyeyle

öncelikli olarak bölgemizde hastalığın moleküler genetik temeli belirlenebilecektir. Bu sonuçların, klinisyenlerle birlikte değerlendirilmesiyle genotip-fenotip ilişkilendirilmesi, olası sağaltım uygulamaları için kaynak tablolar geliştirilebilecek ve buna paralel olarak aileler bilgilendirilerek prenatal tanıya yönlendirilebileceklerdir.

**BÖLÜM 1**  
**GENEL BİLGİLER**

# **1.GENEL BİLGİLER**

## **1.1 Kalıtsal Polikistik Böbrek Hastalıkları**

Polikistik Böbrek Hastalığı-PBH (Polycystic Kidney Disease-PKD), çocuklarda ve yetişkinlerde, başta böbrekler olmak üzere, birçok organda içi sıvı dolu kistlerin oluşması ve zamanla bunların birikmesiyle beliren kalıtsal bir hastalıktır ve yaşa bağlı olarak, başlıca böbrekler olmak üzere çeşitli organlarda işlev kayıplarına, hatta ölüme sebep olabilir (1,2). Otozomal dominant ve otozomal resesif olarak kalıtılan iki tür PBH vardır.

### **1.1.1 Otozomal Dominant Polikistik Böbrek Hastalığı**

Otozomal Dominant Polikistik Böbrek Hastalığı – ODPBH (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease-ADPKD; MIM 173900), birçok sistemi etkileyen bir hastalık olup, toplumda 1: 500- 1: 1000 oranında görülür. Başta böbrekler olmak üzere birçok organda kistik oluşumlar ve anormal bağ dokusu ile karakterizedir. Genellikle bilateral olan böbrek tutulumunun yanı sıra, hastaların %75’inde karaciğer kistleri gözlenirken, daha nadir olarak pankreas, yumurtalıklar ve koroid pleksus gibi epitelyal organlarda da kistlere rastlanır (1,3). Böbreklerde kistler, nefronun tüm segmentlerinden veya toplama kanallarından köken alabildiği gibi; toplama kanallarından köken alanlar, nefronun diğer segmentlerinden köken alanlardan daha büyük ve sayıca daha fazladır (4).Kistler kimi zaman 3 cm üzeri büyüklüklere ulaşabilir(5).

Böbrek kanallarında kistlerin birikmesi ile böbrekler fonksiyonunu kaybeder ve Son Dönem Böbrek Yetersizliği - SDBY(End Stage Kidney Disease-ESRD)’ne neden olur (1,6). ODPBH’da ayrıca, bağ dokusunun zayıflaması nedeniyle arteryel diseksiyon, kalp kapağı anomalileri, ön abdomen duvar fıtığı, menenjiyel ve intestinal divertiküller görülebilir (7). Hastaların %60’ında böbrek fonksiyon kaybından önce hipertansiyon ortaya çıkarken (8), makrohematüri ve idrar yolu enfeksiyonuna yatkınlık da hastalığın diğer belirtileri arasındadır (3).

Hastalığın genetik olarak %85 oranında PKD1 (Polycystic Kidney Disease- 1) ve %15 oranında ise PKD2(Polycystic Kidney Disease-2) geni ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (9,10).



Ancak, bazı ailelerde hastalık belirtileri olmasına rağmen her iki gende de mutasyona rastlanamamış olması ile üçüncü bir aday genin (PKD3) mevcut olabileceği öne sürülmüştür. Fakat bu düşünce henüz kanıtlanamamıştır (11).

SDBY'nin ortaya çıkma yaşı, PKD1 ve PKD2 mutasyonları taşıyan hastalarda, ortalama olarak, sırasıyla 57 ve 69'dur (12). PKD1 mutantları, PKD2 geninde mutasyon bulunan hastalara kıyasla daha ciddi bir klinik tablo sergilerler(13,9).

### **1.1.1.1 PKD1 Geninin Yapısı ve Kodladığı Protein**

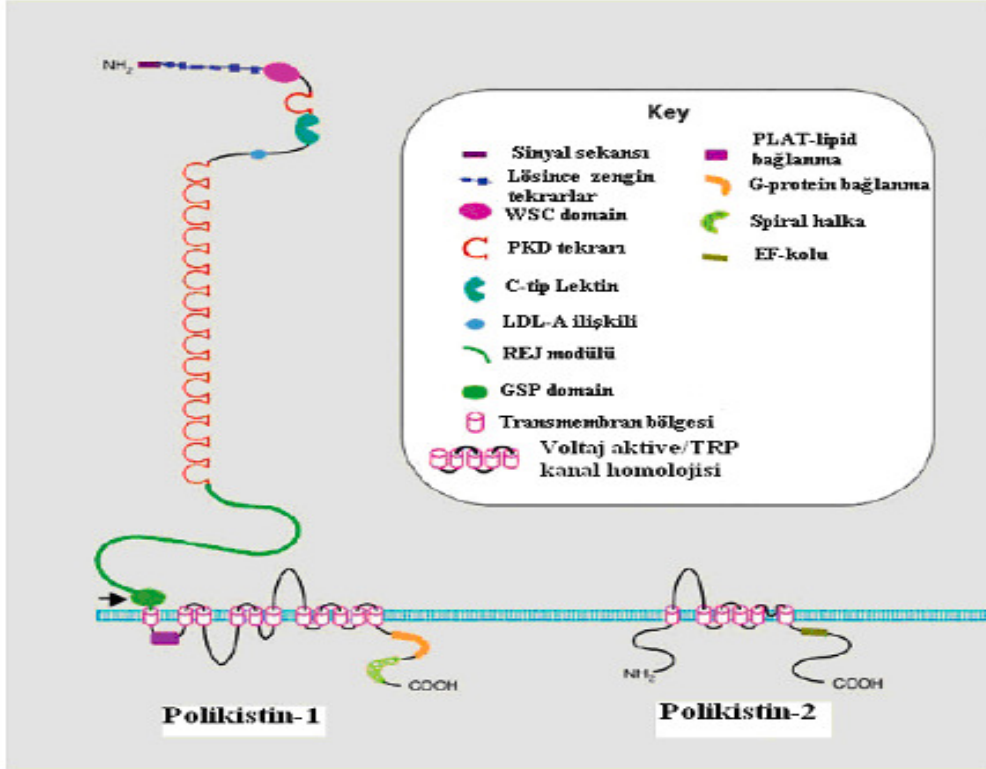
PKD1(MIM 601313), 46 ekzona sahip, yaklaşık 52 kb büyüklüğünde bir gen olup, kromozom 16p13.3'de yer alır. Bu yapıdan 14. 1 kb uzunluğunda bir transkript ile yaklaşık 4302 aminoasitten oluşan 463 kDa büyüklüğünde polikistin- 1 (PK1) proteinini kodlanır. Genin 1- 33 ekzonları arası, kromozom 16p'deki farklı altı bölge ile %95'ten fazla yapısal benzerlik gösterir. Bu bölgeler yalnızca mRNA transkripti olarak eksprese edilir ve yalancıgen (pseudogen) olarak tanımlanırlar(1).

Polikistin- 1, uzun ekstraselüler N, kısa sitoplazmik C terminal bölgelere ve 11 transmembran segmente sahip bir integral membran proteinidir. Sitoplazmik C terminal bölgesi çok sayıda fosforilasyon bölgesine sahiptir. Bu fosforilasyon bölgelerinin hem polikistin-2'nin C terminal bölgesi ile hem de heterotrimerik G proteininin (Guanine nucleotide-binding proteins) aktivasyon bölgesi ile etkileşimde olduğu düşünülmektedir (10). Polikistin- 1 böbrekte distal nefronlarda ve toplama kanallarındaki primer sillerde; safra sistemi ve pankreasta ise epitelyal kanallarda bulunur (14).

### **1.1.1.2 PKD2 Geninin Yapısı ve Kodladığı Protein**

PKD2(MIM 173910)i, 15 ekzona sahip, 68 kb büyüklüğünde bir gen olup, kromozom 4q21'de yer alır. Bu yapıdan 5.4 kb uzunluğunda bir transkript oluşturularak, 968 aminoasitten oluşan yaklaşık 110 kDa büyüklüğündeki polikistin- 2(PK2) proteini kodlanır(15). Bu proteinin sitoplazmik N ve C terminal bölgeleri dışında 6 adet transmembran segmentinin olduğu düşünülmektedir. Polikistin- 2 yapısal olarak, TRP

(Transient Receptor Potential) benzeri bir kalsiyum kanalıdır(16). Polikistin-2'nin HAX-1 (HCLS1 associated protein X-1) ve  $\alpha$ -aktin ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle hücre iskeleti organizasyonu, hücre adezyonu, proliferasyon ve migrasyonda kritik rolü olabileceği düşünülmektedir (10). Polikistin-2 böbreklerin primer sillerinde, bazolateral plazma membranlarında ve endoplazmik retikulum(ER)'da bulunur(4).

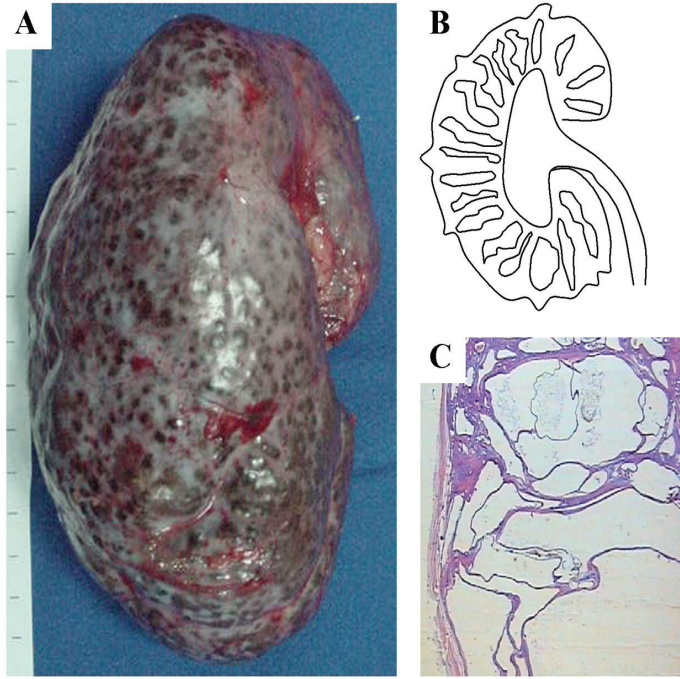


Şekil 1.1: Polikistin-1 ve Polikistin-2 protein yapılarının şematik olarak gösterimi (10)

### 1.1.2 Otozomal Resesif Polikistik Böbrek Hastalığı

Otozomal Resesif Polikistik Böbrek Hastalığı–ORPBH (Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease-ARPKD; MIM263200) böbrek ve karaciğeri etkileyen bir tek gen hastalığıdır. Toplumda taşıyıcılık sıklığı yaklaşık olarak 1:70, görülme sıklığı ise 1:20.000-1:40.000 civarındadır(17,18). Hastalığın başlıca bulguları; böbrek toplama kanallarında ve karaciğerde dilatasyon, solunum yetmezliği, hipertansiyon ve idrar yolları enfeksiyonlarıdır. Böbrek hacmi normalin 10 katına kadar erişebildiği hastalıkta, 1-2 mm çapındaki kistler

genellikle bilateral yerleşim gösterir (19). ORPBH’da böbreklerin çoğu radyal olarak genişler ve iğ şeklindeki (fusiform) kanallar korteks ve medullayı işgal eder. Bu durumda, korteks ve medulla ayrımı kesin olarak yapılamaz (şekil 20)(20,10). Kistler toplama kanallarından köken aldığından, böbrekteki kistik lezyonlarda afferent ve efferent bağlantılar korunmuştur (4,10).



Şekil 1.2: Polikistik Böbrek Hastalığında Böbreğin Renal Patolojisi. A, ORPBH olan 2 yaşındaki bir çocuğa ait böbreğin görünümü: Boyutu 15 cm’e ulaşmış olan böbreğin dış yüzeyinde makroskopik olarak görülen çok sayıda kist gözlenmektedir. B, Radyal dağılım gösteren, korteks ve medulla boyunca genişlemiş toplama kanallarının şematik gösterimi. C, ORPBH’da böbrek dokusunun mikroskop altındaki görüntüsü (20).

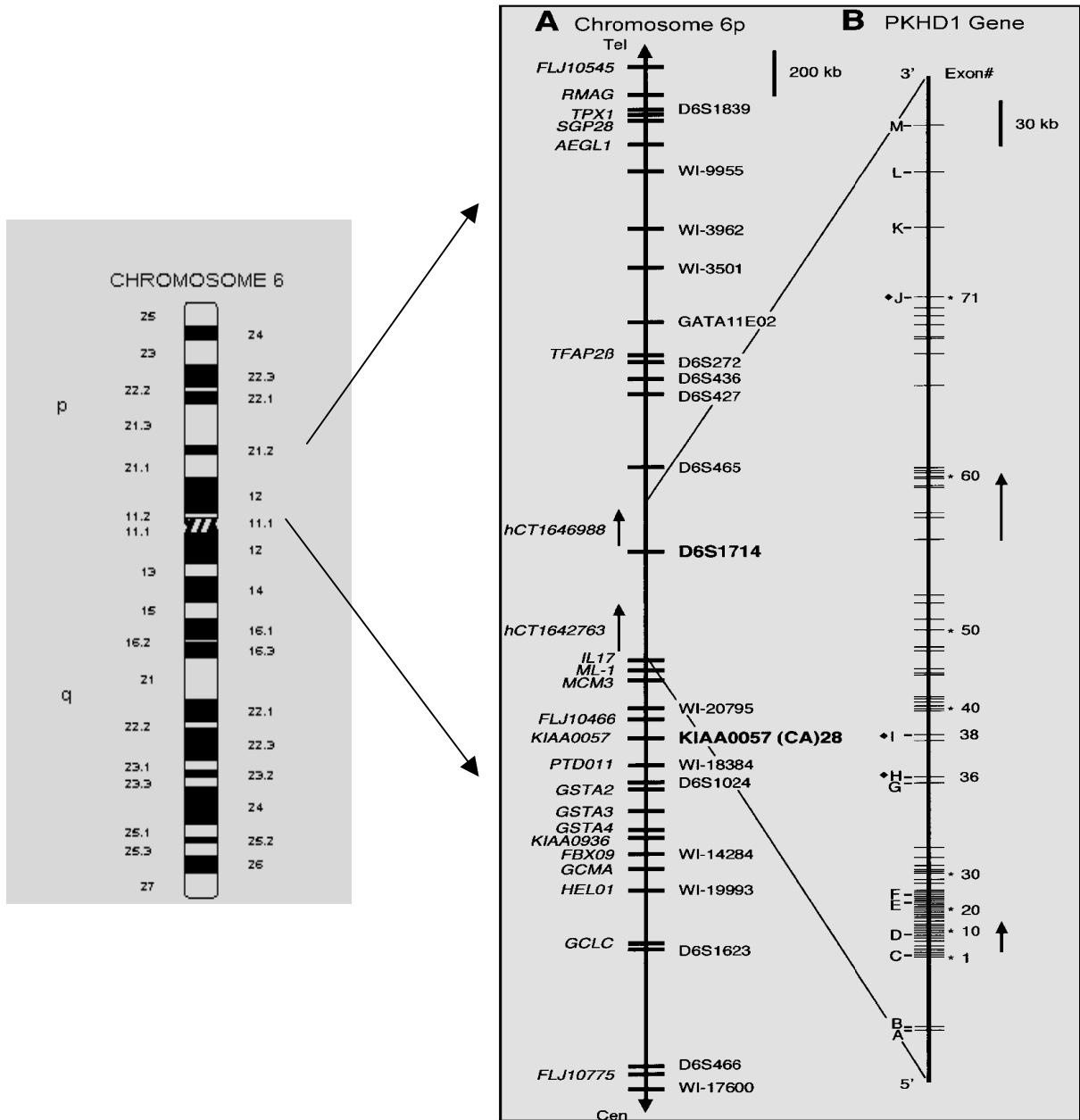
ORPBH, belirtilerin ortaya çıktığı yaşa bağlı olarak; perinatal, neonatal, infantil ve juvenil olarak dört gruba ayrılır. Böbrek ile karaciğer tutulumunun ciddiyeti gruplar arasında farklılık gösterir. Perinatal gruptaki olgularda nefromegali, oligohidroamniyoz ve hafif şiddette safra sistemi anomalileri görülür(21). Neonatal gruptaki hastalarda ise çoğunlukla renal dilatasyon mevcuttur. Hastaların yarısında karakteristik yüz ifadesi (sarkık kulaklar,

basık çene, geniş nazal köprü, gözlerde epikantal oluşumlar), oldukça genişlemiş böbrekler, kol ve bacaklarda deformasyon ve pulmoner hipoplazi ile tanımlı 'potter fenotipi' görülür. Neonatal hastaların yaklaşık %30-50'si doğumdan kısa bir süre sonra solunum yetmezliğinden ölür (22, 23, 24, 25). Birinci yılında hayatta kalabilen hastalara neonatal solunum desteği sağlandığında ve böbrek nakli yapıldığında, hastaların %82'sinde sağ kalım oranı 10 yıl artmıştır(21).

Çoğu hasta tek tip hastalık belirtileri gösterirken, bazı hastalar organ spesifik belirtiler gösterir. Etkilenmiş bireylerin yaklaşık yarısında SDBY gelişir. Bazı hastalarda ise böbrekte tutulum gözlenmezken, baskın olarak karaciğer tutulumu gözlenir. İnfantil tipte sistemik hipertansiyon, böbrek yetmezliği, portal hipertansiyon ve hem karaciğer hem de böbreklerde fibroz görülür. Juvenil hastaların bir kısmında hepatosplenomegali vardır(21). Juvenil tipte kist büyüklüklerinde değişkenlik mevcutken, genellikle böbrek genişlemesi azdır ve hastaların çoğunda karaciğer komplikasyonları bulunur(26). ORPBH'da karaciğer hastalığının başlıca patolojik bulguları arasında safra disgenезinin hepatik lezyonlarına neden olduğu intrahepatik safra kanalı genişlemesi (Caroli Hastalığı) ve konjenital hepatik fibroz (KHF) ile sonuçlanan periportal fibroz ile ilişkili duktal plak malformasyonları bulunur (12). Bu hastalarda hepatik lezyonlar ilerleyerek daha da ciddi bir hal alır. PBH'li sıçan modellerinde yapılan bir çalışmada, karaciğer kistlerinin intrahepatik safra kanallarıyla çevrelenen kolanjiositlerinden meydana geldiği gösterilmiştir. Bu kistlerin zamanla ilerleyip büyüdüğü ve genişlediği de gözlenmiştir (27). KHF hastalarının özellikle kolanjiyokarsinom olmak üzere, iyi ve kötü huylu karaciğer tümörleri açısından artmış riske sahip oldukları bildirilmiştir (28). Diyaliz ya da transplantasyonla SDBY tedavisi gören hastalarda, KHF ve Caroli hastalığı portal hipertansiyona yol açabilir. Daha sonrasında ise gastro-özofajiyel varisler, splenomegali ve tekrarlayan bakteriyel kolanjitler gözlenir. ORPBH'dan etkilenmiş çocukların %80 kadarında ciddi hipertansiyon görülmesinin azalan böbrek fonksiyona bağlı olabileceği düşünülmektedir (12).

### 1.1.2.1 PKHD1 Geninin Yapısı ve Kodladığı Protein

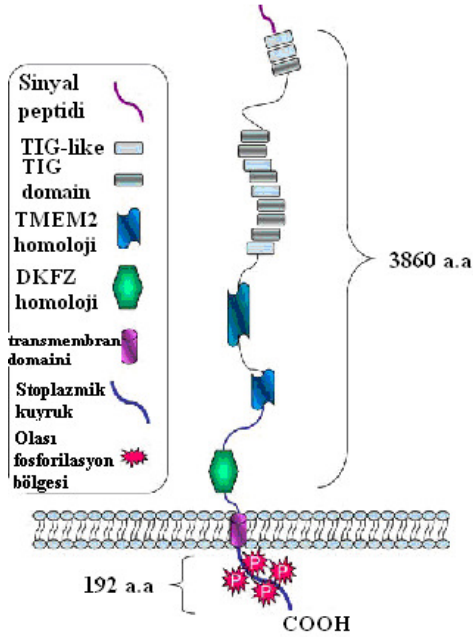
Hastalıkla ilişkilendirilen PKHD1 (Polycystic Kidney and Hepatic Disease1) geni, kromozom 6p21.1-p12'de bulunur ve fibrokistin/polidaktin(FK) proteinini kodlar (29,30). PKHD1 geninin dizisi, 2002 yılında bağımsız iki farklı grup tarafından belirlenmiştir. Bu gen yaklaşık olarak 470 kb büyüklüğünde, 67 ekzon içeren, bilinen en uzun açık okuma çerçevesine (Open Reading Frame: ORF) sahiptir. 16.235 bp uzunluğunda bir transkripsiyon ürünü ve bundan da 4.074 amino asit uzunluğunda FK proteini kodlanır (31,02).



Şekil 1.3: PKHD1 geninin kromozomdaki yerleşimi (21).

Bu proteininin işlevi henüz tam olarak bilinmemekle birlikte safra kanallarının diferansiyasyonunda rol alan bir reseptör olabileceği düşünülmektedir (32). FK proteini, 3.860 aa uzunluğunda hücre dışı N-terminal bölgeye, hücre zarına yerleşen bir transmembran yapıya ve 192 aa uzunluğunda bir hücre içi C-terminal bölgeye sahiptir. N-terminal bölgede TIG(transcription factor immunoglobulin), TIG-like, TMEM2(transmembrane protein 2) homologu olan domeynler vardır (21). Proteinin hücre içi C-terminal domeyni yüksek seviyede glikozillenmiştir (33). FK proteini böbrek toplama kanalında, primer sillerde ve apikal plazma membranında, pankreatik kanal ve intrahepatik safra kanalı epitellerinde ekspresedir (34, 35, 36). FK'nın spesifik bölgelerden proteolitik olarak kesilmesiyle, C terminal bölgeyi içeren en az altı farklı fragman oluşur. Fakat bu işlemde rol alan proteaz henüz tanımlanamamıştır (37).

C-terminal hücre içi fragman, nükleer lokalizasyon sinyali olan KRKVSRLAVTGERTATPAPKIPRIT dizisini içerdiğinden, bu fragman nükleusa taşınır(37).



Şekil 1.4: Fibrokinin / polidaktin (FK) gen yapısının şematik görünümü (21)

Son yapılan çalışmalarda, FK ile PK2'nin primer sillerde ve plazma membranında kısmi ya da bütün olarak fiziksel etkileşim kurdukları, ko-immunopresipitasyonla gösterilmiştir. Ancak, FK ve PK2'nin direk etkileşimde olmadığı, bu etkileşimin üçüncü bir bağlayıcı molekül aracılığıyla olduğu düşünülmektedir (33). Bu bağlayıcı molekülün ise Kinesin-2 olabileceği öne sürülmektedir. Heterotrimerik bir protein olan Kinesin-2, birbirine homolog olan motor alt grupları KIF3A, KIF3B ve ayrıca motor olmayan KAP3'den oluşur (38). Shixuan Wang ve arkadaşları ko-immunopresipitasyon ile KIF3A'nın, FK ve PK2 proteinleri ile fiziksel etkileşimde olduğunu göstermiştir ve ara moleküllerden birinin KIF3A olabileceğini öngörmüşlerdir(33).

### **1.1.2.2 ORPBH Tam Kriterleri:**

ORPBH'nın tanısında aşağıdaki 4 veriden en az 3 tanesi yeterli kabul edilmektedir(22):

- 1) Juvenil veya infant dönemde, kortiko-medullar diferansiyasyon kaybı ile birlikte bileteral renal genişleme olması. Yaşı daha büyük olan hastalarda ise, prekalisyel tübüler ektazinin veya bilateral böbrek kistlerinin varlığı.
- 2) Konjenital hepatik fibrozun histolojik olarak ya da intrahepatik safra kanalı genişlemesinin radyolojik olarak belirlenmesiyle karakterize olan duktal plak malformasyonu.
- 3) ORPBH'nın kesin tanısı: kardeşlerden birinde konjenital hepatik fibrozun ya da Caroli hastalığının bulunması.
- 4) Aile hikayesinde karaciğerde kist oluşumuna yol açan başka hastalıklarla ilgili (MODY tip 5(Maturity Onset Diabetes of the Young), ODPKBH veya nefronofitiz) bir değerlendirmenin olmaması.

ORPBH veya konjenital hepatik fibroz ile ilgili tanımlı mutasyonu olan ailelerde mutasyon taşıyan allellin bulunduğu bireylerde, yukarıda verilen ölçütlere tam uyum gerekmediğinden tanı konulabilir.

### 1.1.2.3 PKHD1 Geninde Gözlenen Mutasyonlar

Yurt dışındaki farklı merkezlerde yapılan çalışmalar sonucunda PKHD1 geninde saptanan 282 mutasyonu kapsayan veri tabanı 2008 yılı sonunda yayımlanmıştır. Bu veri tabanında yer alan araştırmalarda toplam ORPBH olan 45 Türk hastada, 22 değişik ekzonda, 35 farklı mutasyon bulunmaktadır (www.humgen.rwth-aachen.de) Farklı çalışmalarda PKHD1 geninde mutasyon saptama oranının %42 ile %85 oranında değiştiği bildirilmiştir (40). Tüm ekzonlarda mutasyon saptama oranının en fazla %85 olması PKHD1 geninin farklı 'alternatif splice' bölgelerinin olabileceğini düşündürmektedir. Bergmann ve arkadaşlarının yayımladıkları toplu değerlendirmede 40 Türk hastada, tüm ekzonlardaki mutasyonların %50'sinin 5 ekzonda (14, 16, 34, 54, 58B) yer aldığı gösterilmiştir. PKHD1 geninin büyük olması ve mutasyonların genin farklı bölgelerinde bulunması nedeniyle 'hot spot' bölgeler kesin değildir.

2005'te Bergmann ve arkadaşlarının yayımladığı çalışmada I473S ve Y1838C missens mutasyonlarının Türk populasyonunda yaygın olduğu, dolayısıyla atasal kökeninin aynı olmasının muhtemel olduğu öne sürülmüştür(41). R1624W missens mutasyonunun ise nadir bulunan ve olası patojenik bir mutasyon olduğu bildirilmiştir(42).

Tablo1.1: PKHD1 geninde 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60 nolu ekzonlarında litaretürde tanımlı mutasyonlar(39).

Exon	cDNA Değişikliği	aa Değişikliği	Mutasyon Türü	Kökeni
Ex14	c.977G>T	G326V	Missens	Beyaz Amerika
Ex14	c.982C>T	R328X	Nonsense	Fransa
Ex14	c.1106_1113del	G369fs	Delesyon	Portekiz
Ex15	c.1212G>A	W404X	Nonsense	Beyaz Amerika
Ex16	c.1342G>C	G448R	Missens	Beyaz Amerika /Almanya
Ex16	c.1397G>C	G448R	Missens	Beyaz Amerika Almanya
Ex16	c.1397G>C	G466A	Missens	UK/ Kanada
Ex16	c.1409G>A	G470D	Missens	GüneyAmerika
Ex16	c.1456T>C	Y486H	Missens	Afkanistan



EX16	c.1512G>C	Q504H	Missens	Almanya
Ex16	c.1480C>T	R494X	Nonsense	Almanya/ Fransa
Ex16	c.1388delC	P463fs	Delesyon	İtalya
Ex16	c.1409_1410del	G470fs	Delesyon	Beyaz Amerika
Ex32	c.3686G>C	W1229S	Missens	Fransa
Ex32	c.3710G>A	C1237Y	Missens	Almanya
Ex32	c.3747T>G	C1249W	Missens	Danimarka
Ex32	c.4165C>A	P1389T	Missens	İspanya
Ex32	c.4205G>T	C1402F	Missens	Finlandiya
Ex32	c.4220T>G	L1407R	Missens	Slovenya/ Almanya
Ex32	c.4292G>C	C1431S	Missens	Avusturalya
Ex32	c.4415G>A	C1472Y	Missens	İtalya
Ex32	c.4457C>T	P1486L	Missens	Almanya
Ex32	c.4465G>C	D1489H	Missens	Almanya
Ex32	c.4709A>C	Y1570S	Missens	Fransa
Ex32	c.4751G>T	S1584I	Missens	Beyaz Amerika / Bulgaristan
Ex32	c.4838G>A	C1613Y	Missens	Almanya/ Hollanda
Ex32	c.4870C>T	R1624W	Missens	Suudi-Arabistan (3x)/ Hollanda
Ex32	c.4882C>G	P1628A	Missens	Fransa (2x)
Ex32	c.4955A>G	Y1652C	Missens	Hollanda
Ex32	c.5060T>C	I1687T	Missens	Almanya (2x)/ Çek Cumhuriyeti
Ex32	c.5075A>G	C1692Y	Missens	Fransa
Ex32	c.5125C>T	L1709F	Missens	Güney Amerika- Afrika
Ex32	c.5160C>A	D1720E	Missens	Beyaz Amerika
Ex32	c.5221G>A	V1741M	Missens	Beyaz Amerika
Ex32	c.5230A>C	N1744H	Missens	Lübnan
Ex32	c.5236G>A	G1746S	Missens	Beyaz Amerika
Ex32	c.3848C>A	S1283X	Nonsense	Güney Amerika
Ex32	c.4330C>T	Q1444X	Nonsense	Hollanda
Ex32	c.3761_3762del insG	A1254fs	Delesyon	Beyaz-Amerika (10x)/ İsrail (4x)/ UK (2x)/ Güney-

				Amerika/ İspanya/ Almanya (2x)/ Portekiz/ Hollanda
Ex32	c.3958_3959del	G1320fs	Delesyon	Kanada
Ex32	c.4415_4418delins	C1472fs	Delesyon	Beyaz Amerika
Ex32	c.4536_4553del	A1513_V1518del	Delesyon	Hollanda
Ex32	c.4593_4594insT	N1532X	Delesyon	Avustralya
Ex32	c.5371dupG	P1791fs	Delesyon	Almanya
Ex33	c.5342C>T	T1781I	Missens	Beyaz -Amerika
Ex33	c.5353T>C	F1785L	Missens	Almanya
Ex33	c.5360G>T	C1787F	Missens	Almanya/ Fransa
Ex33	c.5365G>C	V1789L	Missens	Almanya
Ex33	c.5323C>T	R1775X	Nonsense	Çek Cumhuriyeti
Ex34	c.5387T>C	L1796S	Missens	Beyaz Amerika
Ex34	c.5410C>T	R1804C	Missens	Fransa
Ex34	c.5498C>T	S1833L	Missens	Beyaz Amerika
Ex34	c.5502G>T	W1834C	Missens	Fransa
Ex34	c.5585C>T	S1862L	Missens	Finlandiya
Ex34	c.5600G>A	S1867N	Missens	US
Ex34	c.5582delT	F1861fs	Delesyon	Fransa
Ex53	c.8312T>C	V2771A	Missens	Fas (3x)/ Tunus
Ex53	c.8317G>T	V2773L	Missens	Hollanda
Ex53	c.8425G>A	G2809R	Missens	Beyaz Amerika
Ex54	c.8518C>T	R2840C	Missens	Beyaz Amerika (2x)/ İsrail/ Hollanda (2x)
Ex54	c.8521A>G	M2841V	Missens	Suudi Arabistan/ UK
Ex58	c.9053C>T	S3018F	Missens	Suudi Arabistan/ UK
Ex58	c.9086A>C	H3029P	Missens	Almanya
Ex58	c.9107T>G	V3036G	Missens	Güney Amerika
Ex58	c.9152T>C	I3051T	Missens	Almanya
Ex58	c.9241A>G	I3081V	Missens	Fransa

Ex58	c.9289G>A	A3097T	Missens	Almanya
Ex58	c.9311T>G	F3104C	Missens	Güney Amerika
Ex58	c.9370C>T	H3124Y	Missens	İtalya
Ex58	c.9464A>G	Y3155C	Missens	Almanya
Ex58	c.9499A>T	I3167L	Missens	Hollanda
Ex58	c.9524A>G	N3175S	Missens	Afrikalı Amerikalı- Karayip
Ex58	c.9530T>C	I3177T	Missens	Almanya (4x)/ UK (2x)/ Sırbistan/ İspanyol/ Hollanda (2x)
Ex58	c.9532G>T	G3178C	Missens	Hindistan
Ex58	c.9625A>C	S3209R	Missens	Slovenya
Ex58	c.9719G>T	R3240L	Missens	Fransa
Ex58	c.9719G>A	R3240Q	Missens	Portekiz(2x)/ Çek- Cumhuriyeti
Ex58	c.9725G>T	G3242V	Missens	Beyaz Amerika
Ex58	c.9767C>T	P3256L	Missens	Almanya
Ex58	c.9319C>T	R3107X	Nonsense	Suriye/ Almanya
Ex58	c.9683C>A	S3228X	Nonsense	Hollanda
Ex58	c.9718C>T	R3240X	Nonsense	İtalya (2x)/ Portekiz
Ex58	c.9765G>A	W3255X	Nonsense	Beyaz-Amerika
Ex58	c.9183delinsTTAAT GACATCAG	T3061fs	Delesyon	Almanya
Ex58	c.9347delT	L3116fs	Delesyon	Almanya/ Fas (2x)
Ex58	c.9689delA	D3230fs	Delesyon	Almanya (2x)/ Fransa (5x)/ Güney Amerika (2x)/ Beyaz Amerika / Brezilya/ İspanya (2x)/ Fransız- Kanada (2x)/ Avusturya
Ex58	c.9727delA	I3243fs	Delesyon	Almanya
Ex60	c.10036T>C	C3346R	Missens	İspanya

Ex60	c.10068T>A	D3356E	Missens	İtalya
Ex60	c.10031T>G	L3344X	Nonsense	Hollanda

Tablo 1. 2: Türk hastalarda gözlenen mutasyonlar(39)

Exon	cDNA değişikliği	aa değişikliği	Mutasyon türü	Hasta sayısı
Exon2	c.4_11del	T2fs	Delesyon	1
Exon14	c.1068_1069dupT	P356fs	Duplikasyon	4
Exon14	c.1116C>G	F372L	Missens	1
Exon14	c.982C>T	R328X	Nonsens	1
Exon15	c.1123C>T	R375	Missens	1
Exon15	c.1180G>A	A394T	Missens	1
Exon16	c.1418T>G	I473S	Missens	2
Exon16	c.1487G>C	R496P	Missens	1
Exon25	c.2695A>C	T899P	Missens	1
Exon29	c.3306delT	Y1102	Delesyon	1
Exon32	c.4778T>A	I1593T	Nonsens	1
Exon32	c.3762_3763insG	P1255fs	İnserisyon	1
Exon32	c.4256_4257delGG	R1419fs	Delesyon	2
Exon33	c.5378_IVS+1del	D1793	Delesyon	2
Exon34	c.5513A>G	Y1838C	Missens	3
Exon37	c.5993T>C	I1998T	Missens	1
Exon43	c.6991dupA	I2331fs	Duplikasyon	1
Exon50	c.8011C>T	R2671X	Nonsens	1
Exon53	c.8315T>C	L2772P	Missens	1
Exon53	c.8385A>C	R2795S	Missens	1
Exon54	c.8492G>A	R2831K	Missens	1
Exon54	c.8552T>C	I2851T	Missens	2

Exon57	c.8899G>T	G2967W	Missens	1
Exon57	c.8829_8830dupC	I2944fs	Duplikasyon	1
Exon58	c.9370C>T	H3124Y	Missens	2
Exon58	c.9523A>G	N3175D	Missens	1
Exon58	c.9319C>T	R3107X	Nonsense	1
Exon58	c.9658A>T	K3220X	Nonsens	1
Exon59	c.9878A>T	D3293V	Missens	1
Exon60	c.10075delG	G3359fs	Delesyon	1
Exon60	c.10077delG	G3359fs	Delesyon	1
Exon61	c.10972_10973del	I3658fs	Delesyon	1
Exon62	c.11215C>T	R3739W	Missens	1
Exon64	c.11408dupA	Q3803fs	Duplikasyon	1
Exon67	c.12027C>G	Y4009X	Nonsens	1
TOPLAM				45

#### 1.1.2.4 Genotip- Fenotip İlişkisi

PKHD1 ile ilgili genotip-fenotip korelasyonunun belirlenmesi, çoklu allelizm (multiple allelism) ve yüksek oranda birleşik heterozigote (compound-heterozygosity) nedeniyle zorlaşmaktadır (18, 43, 41). Genotip-fenotip korelasyonunda, bireysel mutasyonların lokalizasyonundan çok çeşidinin önemli olabileceği düşünülmektedir (10). Bergmann ve arkadaşlarının 2005'te yayımladıkları çalışmalarında, iki güdük (truncating) mutasyon taşıyan tüm hastaların ciddi fenotipik seyrinin olduğu ve perinatal ölümlerle sonuçlandığı, bunun yanı sıra neonatal dönemde yaşayan hastaların ise en azından bir tane “missens” mutasyonu taşıdığı bildirilmiştir (41).

Amino asit değişimleri genellikle ölümcül olmayan fenotiple ilişkilendirilirken, zincir sonlanması mutasyonları neonatal ölümlerle ilişkilendirilmiştir. Neonatal dönemde hayatta kalan bütün hastalarda en az bir tane aminoasit değişimine neden olan mutasyon görülmüştür. Bu mutasyonların oluşturduğu kısmen fonksiyonel protein ürünlerinin ise,

fenotipe daha hafif olarak yansımaktadır (44). Ancak, fenotip açısından iki missens mutasyonu taşıyan hasta ile bir güdük mutasyon taşıyan hasta arasında önemli bir klinik farklılık gözlenmemiştir. Bu nedenle bazı missens değişikliklerin, güdük (truncating) mutasyonlar kadar ciddi olabileceği öne sürülmüştür (41).

#### **1.1.2.5 ORPBH'in Prenatal Tanısı**

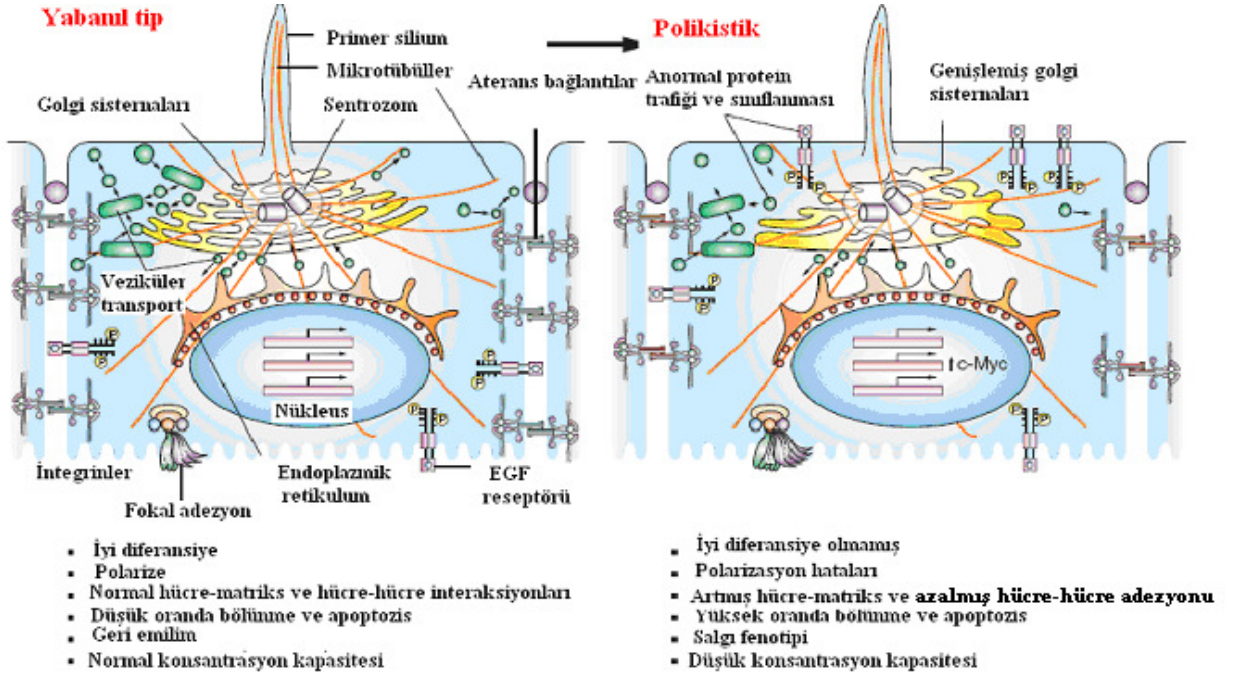
ORPBH birçok olguda ölüme sebep olduğu için, hasta çocuğu olan aileler prenatal tanıdan yararlanabilir. ORPBH' nin fetal ultrason ile prenatal tanısı gebeliğin 21. haftasından sonra yapılabilir. Fetusta ORPBH'nin tipik ultrasonografik bulguları; artmış ekojenite, büyük böbrekler ve oligohidroamniyozdur. Oligohidroramniyoz genellikle gebeliğin 20.haftasından önce görülmemektedir. Prenatal tanıda, gebeliğin 2. trimester (4- 6 ay) döneminde fetal ultrasonda, bilateral olarak büyümüş böbrekler ve artmış böbrek ekojenitesinin gözlenir. Fakat hafif belirtiler sergileyen olgularda ultrason ile prenatal tanı mümkün olmayabilir(17). Haplotip analizinin çoğu durumda uygulanması mümkündür fakat patoanatomik olarak kesin tanısı olmayan ailelerde yanlış teşhis konulabilmektedir. Güvenilir prenatal tanı yalnızca moleküler genetik analizle mümkün olabilmektedir (45). Mutasyonun bulunduğu yere ve türüne göre hastalığın hafif ya da ağır formda olması nedeniyle, hastalardaki mutasyonların saptanması klinik açıdan çok önemlidir.

ORPBH olan çocuğa sahip ailelerde, daha sonraki gebeliklerde ORPBH'li çocuğa gebe olma riski %25'tir. Etkili tedavisi olmayan bu hastalıkta, genetik danışma ve prenatal tanı, ORPBH olan doğumları önlemek bakımından son derece önemlidir.

#### **1.1.2.6 Kist Oluşumu ve Sinyal Yolakları**

Böbrek tübüleri, istenmeyen metabolik son ürünleri, normal değeri %1'in altında olan diğer elektrolitleri, fazla tuz ve suyu süzerek gerekli elektrolitler ile besinleri temizler (46). Bu tübüllerin iç yüzeyi primer sillerle kaplı oluptubüler lüminal akış gibi çevresel mekanik uyarınları algırlarlar(10, 21). PK1, PK2 ve FK' nin primer renal sillerde yer alarak, Ca<sup>2+</sup> geçirgenliğinde, akışı ve fizyolojik hücre fonksiyonunu kontrol eden hücre içi sinyal yolaklarını düzenlediği düşünülmektedir (47,10). Hem FK hem de polikistinler (PK1,PK2)

diferansiyasyon, polarizasyon ve özellikle de geri emilim yapabilen tübüler epitelyal fenotip oluşumunda ve düşük oranda proliferasyon ve apoptozun devamlılığında gereklidir. Bu proteinlerden birinin fonksiyonel olarak işlevini yapamaması, anormal intraselüler trafik ve protein hedeflenmesi, golgi sisternalarının genişlemesi, polarizasyon hataları, artmış hücre-matriks adezyonu, azalmış hücre-hücre adezyonu, artan sıvı salgılanması, artmış proliferasyon ve apoptoz ile karakterize kısmen iyi diferansiye olamamış fenotipe neden olur (Şekil 1. 5 )(47). Son yapılan bir çalışmada ODPBH ve ORPBH’da apoptozun intrinsik yolak (hücre içi) üzerinden uyarıldığı gösterilmiştir. ODPBH hastalarının böbreklerinde kaspaz-8 ekspresyonu, büyük çaplı kist görülen bölgelerde küçük çaplı kist alanlarına kıyasla daha fazladır. Ancak ORPBH’da Kaspaz- 8 ekspresyonunun hastalığın ilerleyen safhalarında arttığı ve kist büyüklüğü ile ilişkili olmadığı rapor edilmiştir (48).



Şekil 1.5. Sağlam ve PKD hastalarında böbrek epitelyal hücrelerinde farkların şematik olarak karşılaştırılması (4).

Primer siller mekanik stimülasyona yanıt olarak, PK1/PK2 kompleksi ile  $Ca^{2+}$  un hücre içine alınmasına aracılık yapar. Böylece endoplazmik retikulum (ER)’dan  $Ca^{2+}$  salınır. cAMP’nin hücresel içeriği, adenil siklaz (AC) sentezi ve cAMP fosfodiesterazların (PDE)





**BÖLÜM 2**  
**GEREÇ VE YÖNTEMLER**

## **2.GEREC VE YÖNTEMLER**

### **2.1 Çalışma grubunun oluşturulması ve örnek alımı**

Otozomal resesif polikistik böbrek hastalarında PKHD1 geninin 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60 nolu ekzonlarındaki mutasyonların taranması amacıyla; İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesinden Doç. Dr. Mustafa Bak ve Doç. Dr. Erkin Serdaroğlu tarafından 12 ; İzmir Tepecik Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nden Doç. Dr. Nejat Aksu tarafından 7 hasta 1 aile; Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Nefroloji Bölümü'nden Uzman Doktor Gül Özçelik tarafından 6; S.B. İstanbul Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Nefroloji Bölümü, Uzman Doktor Nurdan Yıldız tarafından 4 hasta 1 aile; Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Çocuk Nefroloji Bölümü, Doktor Serpil Doğan tarafından 3; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi (DEÜ TFAUH) Çocuk Nefroloji Anabilim Dalı(ABD)'ından Prof. Dr. Salih Kavukçu tarafından 1 Otozomal Resesif Polikistik Böbrek Hastalığı(ORPBH) tanısı konan toplam 33 hasta ve bunlara ilaveten ORPBH tanısı almış hayatta olmaya 2 çocuğun anne-babası çalışmaya dahil edildi. Çalışmanın amacı ve içeriği gönüllülere açıklandı ve DEÜ TFAUH Yerel Etik Komitesinin onayladığı gönüllü bilgilendirme formu ile izinleri alındı. Tüm bireylerden DNA elde etmek amacıyla 2 ml periferik kan etik protokole uygun olarak gerçekleştirildi.

### **2.2 Kan örneklerinden DNA Eldesi**

DNA eldesinde moleküler çalışmaya uygun kalitede kimyasal malzemeler ve 18mega-ohm/cm kalitesinde su kullanılmıştır.

#### **2.2.1 Stok Çözeltilerin Hazırlanışı**

##### **Retikulosit Tuz Solüsyonu(pH=7.2)**

0.13 M NaCl

5mM KCl

7.4 mM MgCl<sub>2</sub>

Çözeltinin hazırlanışı: 0.037 gram (gr) KCl (Sigma P9327), 0.759 gr NaCl (Sigma S 3014) ve 0.157 gr MgCl<sub>2</sub> hassas terazide tartıldı ve distile su ile 70 ml'ye tamamlanarak çözülünceye kadar karıştırıldı. pH'ı 7.2 olacak şekilde ayarlandıktan sonra distile su ile 100ml'ye tamamlanarak +4 °C'de saklandı.

#### 10X Lizis Solüsyonu(pH=7.6)

0.77M NH<sub>4</sub>Cl

0.046 M KHCO<sub>3</sub>

Çözeltinin hazırlanışı: 4.12 gr NH<sub>4</sub>Cl (Sigma A9434) ve 0.46 gr KHCO<sub>3</sub> (Merk 4852) hassas terazide tartıldı, distile su ile 70 ml'ye tamamlanarak çözülünceye kadar karıştırıldı. PH'ı 7.6 olacak şekilde ayarlandıktan sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak +4<sup>0</sup>C'de saklandı.

#### Lizis Solüsyonu(pH=7.6)

100mM NaCl

25mM EDTA

Çözeltinin hazırlanışı: 0.584 gr NaCl ve 0.9305 gr EDTA (Sigma E5134) hassas terazide tartıldı, distile su ile 70 ml'ye tamamlanarak çözülünceye kadar karıştırıldı. pH'ı 7.6 olacak şekilde ayarlandıktan sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak +4<sup>0</sup>C'de saklandı.

#### Tris-EDTA(TE) Tamponu 1X(pH=8.0)

10mmol/L Tris base

1mmol/L EDTA

Çözeltinin hazırlanışı: 0.1211 gr Tris base ve 0.0373 gr EDTA hassas terazide tartıldı, distile su ile 70 ml'ye tamamlanarak çözülünceye kadar karıştırıldı. pH'ı 8.0 olacak şekilde ayarlandıktan sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak +4<sup>0</sup>C'de saklandı.

### Proteinaz K(20mg/ml)(Sigma P2308)

100 mg Proteinaz K üzerine 5ml deiyonize su eklenerek 20mg/ml konsantrasyonda proteinaz K hazırlandı. DNA eldesinde kullanılmak üzere ana stok ve ara stoklar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'te kaldırıldı.

### %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat(SDS)

10 gr SDS(Sigma, L4390) tartılarak üzerine 75ml distile su ilave edildi ve ısıtıcı karıştırıcıda  $65^{\circ}\text{C}$ 'de çözüldükten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.Elde edilen %10'luk SDS DNA izolasyonunda kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

### **2.2.2 Kullanıma Hazır Kimyasallar**

Etanol(%95)(Merck1.00971.2500)

Etanol(%70):%95'lik etanolden 73.6 ml alındı ve 100 ml tamalanacak şekilde üzerine distile su eklendi.

Fenol/Kloroform/İzoamil alkol(25:24:1)pH=8.0(ApplichemA0889,0500)

### **2.2.3 Hasta Örneklerinde Kullanılan Numaralandırma Sistemi:**

Hastalardan EDTA'lı tüpe 2 ml periferik kan uygun yöntemle alındı ve tarafımızdan geliştirilen kodlama sistemiyle tüm örnekler etiketlendi ve bu işaretleme çalışmanın tüm evrelerinde kullanıldı. İlk olarak her aileye 001'den 013'e kadar numaralar verildi. Hasta 18 yaşından büyük ise 'B', küçük ise 'C', hastaların anne ve babalarına ebeveynin kısaltması olan 'E' harfi kullanıldı. Harften sonraki ilk rakam çalışmaya katılan aile bireyine numara verildi. Çalışmaya katılan birey kadın ise 'K', erkek ise 'E' harfleri kullanıldı. Örnek olarak 003C1E numaralandırması, çalışılan örneğin 3. ailenin ilk erkek çocuğunu simgelemektedir. Annesi için 003E1K, babası için 003E1E, ve ailenin ikinci erkek çocuğu için 003E2E kodlaması kullanıldı.

## 2.2.4 DNA İzolasyonunda Uygulanan Protokol A:

Maniatis,T tarafından tanımlanan fenol/kloroform ekstraksiyonuna dayalı yöntem laboratuvar koşullarımıza göre standardize edilmiştir( 49, 50).

### 1.Gün:

-20<sup>0</sup>Cde saklanan EDTA'lı tüplerdeki kan örnekleri çıkarıldı ve oda sıcaklığında çözümleri beklendi.

1. Çözünmüş kan örneklerinden 400 µl alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüplere konuldu.
2. Tüpteki kan hacminin 3 katı(1.2ml) kadar retikulosit tuz çözeltisi eklendi ve elle karıştırıldı.
3. Tüpler oda sıcaklığında karıştırma cihazıyla(ATTD Hybridizer AB-1950) 5 dk karıştırıldı.
- 4 .Karıştırma cihazından alınan örnekler 4<sup>0</sup>C'de 12.000 rpm'de 5dk santrifüjlendi.
5. Üst faz atıldı.
6. Taze hazırlanan 1.2ml 2X lizis solüsyonu eklendi ve pipetaj yapıldı.
7. Tüpler karıştırma cihazında 5 dk karıştırıldı.
- 8.12.000 rpm'de 4<sup>0</sup>C'de santrifüjlendi.
9. Üst faz atıldı.
10. Tüpün dibinde lökosit hücreleri beyaz renkte görülünceye kadar 2X lizis solüsyonu ile muamele edildi.
11. 400 µl lize edici solüsyon eklenip karıştırıldı.
12. Baştaki hacmin 1/10'u(40µl) kadar SDS(%10) ve 5µl Proteinaz K (100 µg/ml) eklendi ve elle ters-yüz edildi.
13. Tüpler 37<sup>0</sup>C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

### 2.Gün:

14. 37<sup>0</sup>C'den çıkarılan tüplerin üzerine tüpteki hacim kadar çeker ocakta 25:24:1 oranında fenol/kloroform/izoamil alkol eklendi.
15. Tüpler 30 sn vortekslendi.
16. 5 dk karıştırıcıda karıştırıldı.

17. 12.000 rpm'de 4<sup>0</sup>C'de santrifüjlendi.
18. Üst faz yeni bir ependorfa alındı.
19. Tüplere -20<sup>0</sup>C'de saklanan %95'lik etil alkol eklendi ve elle karıştırıldı. DNA'nın beyaz iplikçik halinde çökmesi gözlemlendi.
20. Tüpler +4<sup>0</sup>C'de 6.000 rpm'de 2dk santrifüjlendi.
21. Üst faz pipet ile dikkatlice çekildi ve atıldı.
22. Tüpteki pelletin üzerine -20'de saklanan %70'lik etil alkolden 500 µl eklendi.
23. +4<sup>0</sup>C'de 6.000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi.
24. Üst faz pipetle çekilerek uzaklaştırıldı.
25. Tüplerin ağzı açık olarak parafilmle kapatıldı ve iğne ile delikler açıldı. Oda sıcaklığında kurumaması için 2-3 saat bırakıldı.
26. Tüplere 150 µl 0.5X TE tamponu eklendi ve tüpler 37<sup>0</sup>C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. DNA'nın çözünmesi sağlandı.

#### **2.2.4 DNA İzolasyonunda Uygulanan Protokol B Otomatik DNA izolasyonunda Nucleospin Blood(cat no: 740 951.250) kit kullanıldı.**

1. Çözünmüş kan örneklerinden 200 µl alınarak 1.5 ml lik ependorfa kondu. Üzerine 25 µl proteinaz K ve 200µl lizis 3 solüsyonu ilave edilerek 10-20 sn vortekslendi. Örnekler su banyosunda 70 C'de 10-15 dk inkübasyona bırakıldı.
- 2.Su banyosundan alınan örneklerin üzerine 210 µl (%96 lık) etanol eklenerek yeniden vortekslendi.
- 3.Örnekler lizat yükleme tüplerine alındı ve 1 dk 11.000 rpm' de santrifüjlendi.
- 4.Toplama tüpleri yenileriyle değiştirildi ve örneklere 500 µl BW solüsyonu eklenerek 1 dk 11.000 rpm'de santrifüj edildi.
5. Toplama tüpleri yenileriyle değiştirildi ve 600 µl B5 solüsyonu eklenerek 2 dk 11.000 rpm'de santrifüjlendi.
- 6.Toplama tüpleri atılarak yerlerine 1.5 ml'lik ependorf tüpler konuldu ve üzerine 100 µl önceden 70 C'de ılınmış olan BE solüsyonu eklenerek 1 dk beklendi ve 1 dk 11.000 rpm'de santrifüj edildi.

## 2.2.5 DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi:

Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen optik dansite(OD) değerleri aşağıdaki formül ile saptandı.

$$\text{DNA konsantrasyonu} = \text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{seyreltme oranı}$$

$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  okunan oran kullanılarak DNA örneklerinin saflıkları değerlendirildi. Saf DNA'nın  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  değeri 1.8-2.0 arasındadır. Eğer bu oran 1.8'den küçük ise ortamda protein yada fenol bulaşı, eğer oran 2.0'dan büyük ise RNA bulaşı olduğunu gösterir.

Elde edilen DNA'ların saflığını ve miktarını belirlemek için örnekten 2  $\mu\text{l}$  alındı ve 98  $\mu\text{l}$  distile su ile 1/50 oranında seyreltme yapıldı. Hazırlanan örneklerin spektrofotometrede 260 ve 280 nm'deki OD değerleri ölçüldü.

Elde edilen DNA'ların kalitatif miktar tayinleri %1'lik agaroz jele 1  $\mu\text{l}$  DNA örneği yüklenerek yapılmıştır

## 2.3 $\beta$ Actin ve PKHD1 Geninin 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60 nolu Ekzonlarının PCR İle Çoğaltılması:

### $\beta$ actin primer dizileri:

$\beta$ -actin (ileri):5' ATCATGTTTGAGACCTTCAA 3'

$\beta$ -actin (geri):5' CAAGAAGAAGAAGCCCCTGA3'

PCR ürünü uzunluğu 205 bp'dir.

PCR reaksiyonunda PKHD1 geninin 14, 15, 16, 32a, 32b, 32c, 32d, 32e, 32f, 32g, 33, 34, 53, 54,58a, 58b, 58c, 58d, 60 nolu ekzonlarını çoğaltmak için Rosetti ve arkadaşlarının(51) kullandıkları primerler kullanıldı. Bu primerlerin sentezi 'metabion' firmasında yaptırıldı.

### 2.3.1 14 Nolu Ekzonun Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri:

14.ekzon bölgesi için ileri primer: 5'TTCCCAATTTGGGAAGG 3'

14.ekzon bölgesi için geri primer:5'TTAGCAAAGGTGCTTTTG 3'

Kırmızı renk primerleri, sarı ise ekzonu belirtmektedir.

```
24841 tctaggttga cttaccttta caggtagcat ctgggtcatc tttcaccttg taatttaaaa
24901 taaagtaatt ccccaatttg ggaaggtgcg cctgtaatg tttatgcat ctacatgtct
24961 tacaggcaat cgagggttc tttttgaagt tggagatgct gttgaggac tggaactgac
25021 tgaagccacc ccagggtaca ggtggcagat tgtcccta atgccagttctc catttggggt
25081 ttggtcacag gaaggacaac ctttcaggta tgtttagga aaagtggag ccacatcaa
25141 aagcaccttt gctaacctag gtgaggctag gagacagata aggaaggtat caagatttcc
```

### 2.3.2 15 Nolu Ekzonun Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri:

15.ekzon bölgesi için kullanılan ileri primer: 5'TTGGTACTCTTGCTTGACTC 3'

15.ekzon bölgesi için kullanılan geri primer: 5'CTGGCAACAGAGAAAAGG 3'

```
27481 tctttattac cataaaagaa gacaaagtac aagggcagtc atttggtggt tcagtgattc
27541 aggccttggt tactcttgct tgactctatg ttctacttta cagagcacgg ctcagtggtt
27601 tctttgtggc tccagagaca aataattaca ctttctggat tcaggcagat agccaagctt
27661 ccttgcattt cagttggtca gaggaacca ggactaaggt attcactgtc ttctcattt
27721 cttttctct gtgcccagtc ccataccat gaagaaagaa agaatcaaag ttaagctct
```

### 2.3.3 16 Nolu Ekzonun Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri:

16.ekzon bölgesi için kullanılan ileri primer :5'TGCATAGTATTGATCATG 3'

16.ekzon bölgesi için kullanılan geri primer :5'AGCTCCATGGGACTGGAAAG 3'

```
28921 agttcaaaac tctcttgata gtagcagttc agacacttag tgtttgagaa agagatgcct
28981 ggaagcctgoa tagtattgat catgatatgc ttatttgggc ataggtgaaa gtggcctcca
29041 tcagcgtcgg cactgctgac tggtttgact cctgggagca gaatagggat gaagggacct
29101 ggcagcagaa gactcccaag ttggagctgt tgggtggagc catgtactac ctggaagcag
```



29161 agcatcatgg gatagcccca agcaggggga ttaggattgg tgtccagatt cacaacacct  
29221 ggctgaatcc tgatgtggtc accacttacc tacgggagaa gcaccagatc cgagtccgag  
29281 ccagaggct tccagaagta caggtctgtg tctctttcca gtcccatgga gctgaactct

#### 2.3.4 32 Nolu Ekzon İçin Kullanılan Primer Dizileri:

32 nolu ekzon 1608 bp büyüklüğünde olduğu için A, B, C, D, E, F, G olmak üzere 7 kısma ayrılarak çoğaltılmıştır.

A. İleri primer: 5'TCTTAGTTCAGAATATCAG 3'

Geri primer: 5'TCATACATGAAGGTGAAG 3'

61381 gtgctatgaa t tcttagttc agaatatcag ctataatatt ttgctttccg tattcatact  
61441 ttaggagggga ccatcctcag catctcagga ataggettca gcagggacc agctttgggt  
61501 tgggtacttg tgggcaatcg gtctgtgac attgtgaact taacggaggc gagcatctgg  
61561 tgtgaaacc tgccagcccc ccagataccc gatgcgggcg ctcccactgt tccagctgcc  
61621 gtggaggtct gggctggcaa caggttcttc gcccggtggtc cttaccaag cttggtgggg  
61681 aaaggcttca ccttcatgta tgaagcggca gcaacaccag tagtactgc catgcaagga

B: İleri primer: 5' TGGGCTGGCAACAGGTTC 3'

Geri primer: 5' GCCATTATCCGAGGCATC 3'

61621 gtggaggtct gggctggcaa caggttcttc gcccggtggtc cttaccaag cttggtgggg  
61681 aaaggcttca ccttcatgta tgaagcggca gcaacaccag tagtactgc catgcaagga  
61741 gaaatcacia atagcagcct gagcctgcat gtggaggaa gtaacctct caactcagtc  
61801 atccttctgg ggaacctgaa ctgtgatgtt gagacacagt cttccaggg caacgtgagc  
61861 ctgtctggat gctccatccc tcttcacagt ctggaggetg gcatctatcc tctccaagta  
61921 cgtcagaagc agatgggatt tgctaataatg tctgtggtgc tccagcaatt tgcagtgatg  
61981 cctcggataa tggccatctt cccatcgcag gttcggcat gtggtgggac catacttact

C: İleri primer: 5'ATGGGATTTGCTAATATG 3'

Geri primer: 5'GACAGGACTTGCCTCTTC 3'

61921 cgtcagaagc agatgggatt tgctaatatg tctgtggtgc tccagcaatt tgcagtgatg  
61981 cctcggataa tggccatctt cccatcgcag ggctcggcat gtggtgggac catacttact  
62041 gtgaggggggt tgcttcttaa ctctagaagg aggtcagttc gggttgacct ctcggtctct  
62101 tttactttgtg tgattttgag tttgggagac cacaccattc tctgccaggt tagcctggag  
62161 ggtgaccocct tgccctggagc ttccttctcc ctgaacgtca cagtccctggt caatgggcta  
62221 accagcgagt gtcaggggaa ttgcactctt ttcataaggg aagaggcaag tctgtcatg

D: İleri primer:5'GACCACACCATTCTCTGC 3'

Geri primer: 5'TAAAAAACTGACAGGTAG 3'

62101 tttactttgtg tgattttgag tttgggagac cacaccattc tctgccaggt tagcctggag  
62161 ggtgaccocct tgccctggagc ttccttctcc ctgaacgtca cagtccctggt caatgggcta  
62221 accagcgagt gtcaggggaa ttgcactctt ttcataaggg aagaggcaag tctgtcatg  
62281 gatgccttgt ccacaaacac cagtgggtct ctgaccactg tgctgattag gggtcagagg  
62341 ttagccacca cagctgatga gccgatggta tttgtggatg atcaacttcc ttgcaatgta  
62401 acttttttta atgcaagcca cgttgtgtgc cagacaagag acttgcccc aggacccac  
62461 tacctgtcag ttttttatac aagaaatggg tatgcttgtt ctggtaatgt ttccagacac

E: İleri primer: 5' GCAATGTAACCTTTTTTAATGC 3'

Geri primer: 5' TCCTATGTGATACCAAAG 3'

62341 ttagccacca cagctgatga gccgatggta tttgtggatg atcaacttcc ttgcaatgta  
62401 acttttttta atgcaagcca cgttgtgtgc cagacaagag acttgcccc aggacccac  
62461 tacctgtcag ttttttatac aagaaatggg tatgcttgtt ctggtaatgt ttccagacac  
62521 ttctacatta tgccccagt gtttcattat tttcctaaga atttcagctt acatgggtgga  
62581 agcctcttga ccatagaggg cacaggcctg agaggacaga acaccagtc agtctatatt  
62641 gaccagcaga cctgcctgac ggtgaacatc ggtgctgagc tcatccggtg cattgttccc  
62701 acagggaatg gctctgttgc cctggaaata gaggtagatg gacttttgta tcacatagga

F: İleri primer: 5'AGCTCATCCGGTGCATTG 3'

Geri primer: 5'ATAACTCTTGAGGTGAAC 3'

62641 gaccagcaga cctgcctgac ggtgaacatc ggtgctgagc tcacccgggtg cattggtccc  
62701 acagggaaatg gctctgttgc cctggaaata gaggtagatg gactttggta tcacatagga  
62761 gtcattgggtt ataacaaggc ctttacccca gaattgatct ctatttctca gagcgatgac  
62821 atcttaacct ttgcagtggc ccagatctca ggagctgcaa acattgacat ttttatagga  
62881 atgtcaccct gtgtgggtgt ctctggtaac cacaccgttc tcagtgcgt ggtcccttcc  
62941 cttccggccg gggagtacca cgtcagaggc tatgactgca tcagaggggtg ggcctcatct  
63001 gccctggtgt tcacctcaag agttattatt acagcagtga cggagaactt cggtaagtca

G: İleri primer: 5'GGGAGTACCACGTCAGAG 3'

Geri primer: 5'TCCAGAAGTGAAAGGAGC 3'

62941 cttccggccg gggagtacca cgtcagaggc tatgactgca tcagaggggtg ggcctcatct  
63001 gccctggtgt tcacctcaag agttattatt acagcagtga cggagaactt cggtaagtca  
63061 agcaaataag acagcacact ttctttatgt aatgaattg gtagctcctt tcacttctgg  
63121 aaagtagaaa attaacacaa tctgctgat ggaaggaaag agaagccac tggcttctta

### 2.3.5 33 Nolu Ekzon İçin Kullanılan Primer Dizileri:

33.ekzon bölgesi ileri primer : 5' GATCAAGAACTTGTACCTTTGTC 3'

33.ekzon bölgesi geri primer : 5' TTAACCAAAGAATATCATTTC 3'

64621 agttgagtaa agaagggaga tttgctgta tgatcaagaa cttgtacott tgtctttaa  
64681 ggctgcctgg gtggaaggct ggtgcatgtg ttggagcgg gattttctcc agggaaatgtc  
64741 tcagctgctg tgtgtggtgc tccctgccga gtccctggcta atgctacagt gtctgccttc  
64801 agctgcttgg ttctgcccct ggatggtgag taagatgcc acacacatat attttaaagc  
64861 atatatatgg aaatgatatt ctttggttaa ttctatTTTT gtgattaatg ctgtactgac

#### 2.3.6.34 Nolu Ekzon İçin Kullanılan Primer Dizileri:

34.ekzon bölgesi ileri primer : 5'TTCTTTCCTAATGGTGAC 3'

34.ekzon bölgesi geri primer : 5'TTTGTGGGGAAGTTCAGGG 3'

```
69961 ctgtggttct ttctaatgg tga tgtttc ctgcagtgtc cttggccttc ctgtgtggcc
70021 tgaagcgtga ggagacagc tgtgaggctg ccagacacac ctatgtgcag tgtgatttga
70081 cagttgccat ggcgacagag caactgcttg aatcgtggcc ttacctctac atttgcgagg
70141 aaagttccca atgcctcttt gtgccagatc attgggcaga gtcaatgttt ccatcattct
70201 cgggcctctt taccag gtaa ctttaccttc tcctccctg aacttccca caaatgcttg
```

#### 2.3.7 53 Nolu Ekzon İçin Kullanılan Primer Dizileri:

53.ekzon bölgesi ileri primer : 5' TTGTTTTTGTGACATATC 3'

53.ekzon bölgesi geri primer : 5' TCAACATGCTCGCAATCC 3'

```
296161 tacacagctc ccaaactgct gggagaacc cagaataaac acgtaattc t t g t t t t t g t g
296221 acatatc tga gcaatttctt tttcttccac agacagaact gtccttgtgg atacagatct
296281 tccattcttc aaagggctgt atgtgatggg gaccttagac ttccctgtgg acagaagcaa
296341 t g t t c t g a g t g t g g c a t g c a t g g t c a t t g c a g g c g g g g a g c t g a a a g t t g g t g t a a a g
296401 gcacaa g g a t t g c g a g c a t g t t g a g a a t t a t a t t c t g t g a g a a g g g g c t c t g g g a a a c a g
```

#### 2.3.8 54 Nolu Ekzon İçin Kullanılan Primer Dizileri:

54.ekzon bölgesi ileri primer: 5' TGCAATTTCTCCCTCTCTTTC 3'

54.ekzon bölgesi geri primer: 5' TTGCCTAAAAGGGTGTTTGG 3'

```
311641 atttctccct ctctttcttt taatttc aaa ttgatttgaa tgatatactt ttctttgtaa
311701 acaggtactt tagaaaatcc cttagaaaag gaacaaaagc ttctgattct ccttagagcc
311761 tcagagggag tcttttgtga ccgatgaat ggaattcata ttgaccagg aacaattggt
311821 aagagtataa tatagttttt attaaaaata aaatgcatgt gtgtgtattg t g t g c t t g t g
```

### 2.3.9 58 Nolu Ekzon İçin Kullanılan Primer Dizileri:

58 nolu ekzon 879 bp büyüklüğünde olduğu için A, B ,C, D olmak üzere 4 kısma ayrılarak çoğaltılmıştır.

A: İleri primer: 5' AGGAAAGTACCTGATGAC 3'

Geri primer: 5' GAACCACAAGGTTATTAG 3'

```
338881 tcttaatgcc ccaaaatggg ccattettca gccttttgtg ggaagagga aagtacctga
338941 tgacatgcat ttgtttatag gtgtccttca acttettaat gtggaaattc agaacttcgg
339001 gtcaccattg tactcatctg ttgaattcag taatgtgtca gcaggatcct ggatcatatc
339061 atctactctg caccagagct gtggcggggg cattcatgca gctgccagtc atggagtact
339121 tttaaagtac aatattgtgt ttggcacagc tggccatggc atagatttag agggtcaggc
339181 ctatactgtc actaataacc ttgtggttct gatgacacag ccagcgtggt ccaccatttg
```

B: İleri primer: 5' ATATTGTGTTTGGCACAG 3'

Geri primer: 5' AGTCCACTTTCCTTATAG 3'

```
339121 tttaaagtac aatattgtgt ttggcacagc tggccatggc atagatttag agggtcaggc
339181 ctatactgtc actaataacc ttgtggttct gatgacacag ccagcgtggt ccaccatttg
339241 ggtggcggga atcaaagtga accaggtaaa ggacatcaac ctccatggca acgttggtggc
339301 aggatcagag agacttggct ttcacatccg aggccacaag tgctcctctt gtgaactgct
339361 ttggtctgac aatgtggcgc attcaagtct tcatggcett catctctata aggaaagtgg
339421 acttgacaac tgtaccagaa tctctggcct cttggctttc aagaactttg actatggtgc
```

C: İleri primer: 5' GAACTGCTTTGGTCTGAC 3'

Geri primer: 5' ATGACTGAATTCCTAAGC 3'

```
339301 aggatcagag agacttggct ttcacatccg aggccacaag tgctcctctt gtgaactgct
```

339361 ttgggtctgac aatgtggcgc attcaagtct tcatggcctt catctctata aggaaagtgg  
339421 acttgacaac tgtaccagaa tctctggcctt ctggccttc aagaactttg actatgggtgc  
339481 catgttacat gtagagaaca gcgtggagat agagaacatt actctggtag acaatactat  
339541 tggctcttttg gcagtagtgt atgtattttc tgctccacaa aattccgtca aaaaagtgca  
339601 gatttgtgott aggaattcag tcatgtggc caccagctct tcttttgact gcattcagga

D: İleri primer: 5' AAAATTCCGTCAAAAAAG 3'

Geri primer: 5' ATGGATGTATGAAATGGC 3'

339541 tggctcttttg gcagtagtgt atgtattttc tgctccacaa aattccgtca aaaaagtgca  
339601 gatttgtgctt aggaattcag tcattgtggc caccagctct tcttttgact gcattcagga  
339661 caaagtgaag ccgcactcag ccaacttgac atcaacagat agagctccct ccaatccaag  
339721 aggaggtcga attggtattc tgtggcctgt attcacctca gaaccaaate agtggcctca  
339781 ggagccatgg cacaaagtga ggaatgatca ttcaatttca ggaatcatga aacttcaagg  
339841 taggatgttt tattttatct aggcagtggcc attcataca tccatgcata aaatttttaa

### 2.3.10 60 Nolu Ekzon İçin Kullanılan Primer Dizileri:

60. ekzon bölgesi için ileri primer: 5'CATGAAATGAAAGAGTTGC 3'

60. ekzon bölgesi için geri primer: 5' ACCACAGGCATTGCATTC 3'

343021 tgtatattttt cttcttgctg cttatcatga aatgaaagag ttgcttttttg actgtcttca  
343081 caggaaagat ttaggaaaag tagtctgtcc tgaattagac tgtgcaagtc caagaaaata  
343141 tctcttcaag gatctggatg ggagagccct gggctctgct ccaccagttt ctgtatttcc  
343201 taaaacagag gcagaatgga ctgcatcctt cttcaacgca ggtaagctat atctgaatgc  
343261 aatgcctgtg gttagaggcaa gggctgtgtg gaaggagctg gttttgctgt gctcactgag

Tablo 2.1: Primerlerin ve PCR ürünlerinin büyüklükler

Ekzon	Ürün (bp)	İleri Primer (5'-3')	Geri Primer(5'-3')
14	247	TTCCCCAATTTGGGAAGG	TTAGCAAAGGTGCTTTTG
15	193	TTGGTACTCTTGCTTGAC	CTGGCAACAGAGAAAAGG
16	347	TGCATAGTATTGATCATG	AGCTCCATGGGACTGGAA AG
32A	312	TCTTAGTTCAGAATATCAG	TCATACATGAAGGTGAA
32B	365	TGGGCTGGCAACAGGTTC	GCCATTATCCGAGGCATC
32C	345	ATGGGATTTGCTAATATG	GACAGGACTTGCTCTTC
32D	350	GACCACACCATTCTCTGC	TAAAAAACTGACAGGTA
32E	368	GCAATGTAACCTTTTTTAATGC	TCCTATGTGATACCAAAG
32F	349	AGCTCATCCGGTGCATTG	ATAACTCTTGAGGTGAAC
32G	171	GGGAGTACCACGTCAGAG	TCCAGAAGTGAAAGGAG
33	239	GATCAAGAACTTGTACCTT	TTAACCAAAGAATATCAT
34	288	TTCTTTCCTAATGGTGAC	TTTGTGGGGAAGTTCAGG
53	215	TTGTTTTTGTGACATATC	TCAACATGCTCGCAATCC
54	305	TGCAATTTCTCCCTCTCTT	TTGCCTAAAAGGGTGTTT
58A	283	AGGAAAGTACCTGATGAC	GAACCACAAGGTTATTAG
58B	292	ATATTGTGTTTGGCACAG	AGTCCACTTTCCTTATAG
58C	272	GAACTGCTTTGGTCTGAC	ATGACTGAATTCCTAAGC
58D	307	AAAATTCCGTCAAAAAG	ATGGATGTATGAAATGGC
60	227	CATGAAATGAAAGAGTTGC	ACCACAGGCATTGCATTC

#### 2.4 PCR Karışımı ve Hazırlanışı:

DNA Taq polimeraz enzimi(5u/ul): MBI Fermantas Cat no:EPO402

Hotstart Taq premix: RBC SensiZyme 2x:500 ul x 5 vials

DNTP'ler(100umol/ml):

MBIFermantasCatno:R0141dATP,R0151dCTP,R0161dGTP,R0171dTTP

PCR'da kullanmak üzere her bir 100 $\mu$ mol/ml dNTP'den 10 $\mu$ l alınarak 0.2 $\mu$ l'lik tüpe konuldu ve üzerine 90 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O eklenerek 100 $\mu$ l'ye tamamlandı. Elde edilen 10mM'lık dNTP karışımı -20<sup>0</sup>C'de saklandı.

32D, 32F ve 34'üncü ekzon için Hotstart Taq premix enzimi kullanıldı.

Taq polimeraz enzimi buz içerisinde tutuldu ve eklendikten sonra iyice karışması için filtrelili pipet uçları kullanarak pipetaj yapıldı. PCR reaksiyonu herhangi bir kontaminasyonun kontrolü açısından karışım olarak hazırlandı ve karışım her bir 0.2'lik PCR tüpüne 23  $\mu$ l olacak

şekilde dağıtıldıktan sonra 2 $\mu$ l örnek DNA'ları eklenerek pipetaj yapıldı ve hızlı bir şekilde PCR cihazına(Termal cyclers) yerleştirildi.



Tablo 2. 2: Ekzon 16, 32C'nin PCR karışım miktarlarının gösterimi

Ekzon No	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	Kullanılan hacim	
			16	32C
<b>dH<sub>2</sub>O</b>			15.5µl	14.5µl
<b>Tampon</b>	10X	10X	2.5µl	2.5µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25mM	25mM	4µl	5µl
<b>dNTP</b>	10mM	10mM	0.5µl	0.5µl
<b>İleri primer</b>	100pmol/µl	10pmol/µl	0.8µl	0.8µl
<b>Geri primer</b>	100pmol/µl	10pmol/µl	0.8µl	0.8µl
<b>Taq polimeraz</b>	5U/µl	1U	0.2µl	0.2µl
<b>DNA</b>		~50ng	1µl	1µl
<b>TOPLAM</b>				25µl

Tablo 2.3 : Ekzon 14, 15, 32A, 32B, 32E, 32G, 33, 53, 54, 58A, 58B, 58C, 58D, 60'ın PCR karışım miktarlarının gösterimi.

	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	Kullanılan hacim
<b>dH<sub>2</sub>O</b>			16.7µl
<b>Tampon</b>	10X	10X	2.5µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25mM	25mM	2.5µl
<b>dNTP</b>	10mM	10mM	0.5µl
<b>İleri primer</b>	100pmol/µl	10pmol/µl	0.8µl
<b>Geri primer</b>	100pmol/µl	10pmol/µl	0.8µl
<b>Taq polimeraz</b>	5U/µl	1U	0.2µl
<b>DNA</b>			1µl
<b>Toplam</b>			25µl

Tablo 2.4 : Ekzon 32D, 32F ve 34'ün PCR karışım miktarlarının gösterimi

	<b>İlk konsantrasyon</b>	<b>Son konsantrasyon</b>	<b>Kullanılan hacim</b>
dH <sub>2</sub> O	-	-	<b>9,5 ul</b>
İleri primer	<b>100 pmol/ul</b>	<b>10 pmol/ul</b>	<b>1 ul</b>
Geri primer	<b>100 pmol/ul</b>	<b>10 pmol/ul</b>	<b>1 ul</b>
DNA	-	<b>50 ng</b>	<b>1 ul</b>
2X SensiZyme premix	<b>2x</b>	<b>1x</b>	<b>12,5 ul</b>
Toplam	-	-	<b>25 ul</b>
	<b>İlk konsantrasyon</b>	<b>Son konsantrasyon</b>	<b>Kullanılan hacim</b>
dH <sub>2</sub> O	-	-	<b>9,5 ul</b>
İleri primer	<b>100 pmol/ul</b>	<b>10 pmol/ul</b>	<b>1 ul</b>
Geri primer	<b>100 pmol/ul</b>	<b>10 pmol/ul</b>	<b>1 ul</b>
DNA	-	<b>50 ng</b>	<b>1 ul</b>
2X SensiZyme premix	<b>2x</b>	<b>1x</b>	<b>12,5 ul</b>
Toplam	-	-	<b>25 ul</b>

#### 2.4.1 PCR Koşulları

$\beta$ -Actin genini PCR ile çoğaltmak için Tablo 2.4: deki PCR profili kullanıldı.

Tablo 2. 4:  $\beta$ -Actin geninin PCR profili

<b><math>\beta</math>- Actin</b>			
<b>Denatürasyon</b>	95 <sup>0</sup> C	5dk	
<b>Annealing</b>	95 <sup>0</sup> C	30sn	35döngü
	58 <sup>0</sup> C	30sn	
	72 <sup>0</sup> C	30sn	
<b>Sonlanma</b>	72 <sup>0</sup> C	5dk	
	4 <sup>0</sup> C	10dk	

PKHD1 geninin 14, 15, 16, 32A, 32B, 32D, 32E, 32F ve 32G nolu ekzonlarını PCR ile çoğaltmak için Tablo 2.5 deki PCR profili kullanıldı.

Tablo 2.5: Ekzon 14, 15, 16, 32A, 32B, 32D, 32E, 32F ve 32G'nin PCR profili

EKZON NO	14	15	16	32A	32B	32E	32G	Süre	32D ve 32F, süre
<b>Denatürasyon</b>	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	2dk	95°C, 10dk
<b>Annealing</b>	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	30sn	94°C, 30sn
	49°C	55°C	56°C	51°C	60°C	53°C	53°C	30sn	60°C, 45sn
	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	30sn	72°C, 30sn
<b>Sonlanma</b>	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	10dk	72°C, 3dk
	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	30dk	4°C, 30dk
<b>Döngü sayısı</b>	36	35	31	38	35	35	35		35

PKHD1 geninin 33, 34, 53, 54, 58A, 58B, 58C, 58D, 60 nolu ekzonlarını PCR ile çoğaltmak için Tablo 2.6 daki PCR profili kullanıldı.

Tablo 2.6: PKHD1 geninin 33, 34, 53, 54, 58A, 58B, 58C, 58D, 60 nolu ekzonlarının PCR profili

EKZON NO	33	34	53	54	58A	58B	58C	58D	60	SÜRE
<b>Denatürasyon</b>	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	2dk
<b>Annealing</b>	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	30sn
	55°C	57.5°C	53°C	60°C	53°C	55°C	53°C	53°C	55°C	30sn
	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	30sn
<b>Sonlanma</b>	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	10dk
	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	30dk
<b>Döngü sayısı</b>	35	30	35	35	35	35	35	35	35	

PKHD1 geninin 32C nolu ekzonunu PCR ile çoğaltmak için Tablo 2.7 deki PCR profili kullanıldı.

Tablo 2. 7: PKHD1 geninin 32C nolu ekzonlarının PCR profili

EKZON NO	32C	Döngü sayısı	Süre
<b>Denatürasyon</b>	94°C		5dk
<b>Annealing</b>	94°C	30	45sn
	61°C		30sn
	72°C		45sn
<b>Sonlanma</b>	72°C		5dk
	4°C		30dk

## 2.5 PCR Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jel Elektroforeziyle Kontrol Edilmesi

Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler

### 5X Tris Buffer EDTA(TBE)Stok Tamponun Hazırlanışı:

54gr Tris base(Sigma T 8524) ve27.5gr borik asit(Sigma B 6768) tartılarak 800ml distile suda çözüldü. Üzerine 20ml 0.5M EDTA(pH =8.0) ilave edildi ve stok çözeltinin pH'sı 8.3 olacak şekilde pH metre ile ayarlandı. Son hacim 1000ml'ye tamamlandı.

Elektrofrezde stok 5X TBE çözeltisinden 0.5X hazırlanarak kullanıldı.

Agaroz:( Sigma A 5093-100G)

Yükleme Tamponu(Loading dye):

Yükleme tamponu olarak %40 sükröz ve %0.25 bromofenol mavisi karışımı kullanıldı.

Etidyum Bromür:

10µg/ml'lik stoktan örnek yüklenecek jele uygun olacak şekilde kullanıldı.

DNA marker:(Fermantas SMO371)

### %2'lik Agaroz Jele Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi:

Kullanılacak tanka uygun %2'lik agaroz jel hazırlandıktan sonra tankın içine yerleştirildi ve üzerine çıkacak kadar 0.5X TBE tamponu eklendi. PCR ürünlerinden 4µl alındı ve 1µl yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra 5µl'lik örnek karışımı kuyulara yüklendi. Yükleme işleminden sonra tankın kapağı kapatıldı ve güç kaynağı(ATTA-crosspower 500) 80 volt 30 miliampere ayarlanarak örnekler 45dk yürütüldü.

### **2.5.1 PCR Ürünlerinin Kontrolü ve Fotoğraflanması**

β-Actin genine ve PKHD1 geninin 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58 ve 60 nolu ekzomlarına ait PCR ürünleri yukarıda tanımlanan agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü. Yürütme işleminden sonra UV altında jel görüntülendi. Ekzon numaralarına göre beklenen PCR ürün büyüklükleri yukarıdaki 2.1 nolu tabloda belirtilmiştir.

### **2.6 DNA Dizi Analizi**

Her hasta için 25µl'lik PCR ürünü elde edildi ve DNA dizi analizi için Güney Kore'de ki MacroGen([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) firmasına gönderildi. ABI 3100-3700 mikro kolonla, florasan boya sonlanım yöntemiyle işaretlenen DNA dizi verilerinin eldesiyle her örnek için hem ileri hem de geri primerle DNA dizi analizinin yapılması istendi. Örnek başına 2µl primer(10pmol/µl) PCR ürünleri ile birlikte gönderildi. Sekans sonuçları PKHD1 geninin NCBI'da tanımlı olan NC\_000006.10 nolu nükleotid dizisi referans alınarak değerlendirildi.

**BÖLÜM 3**  
**BULGULAR**

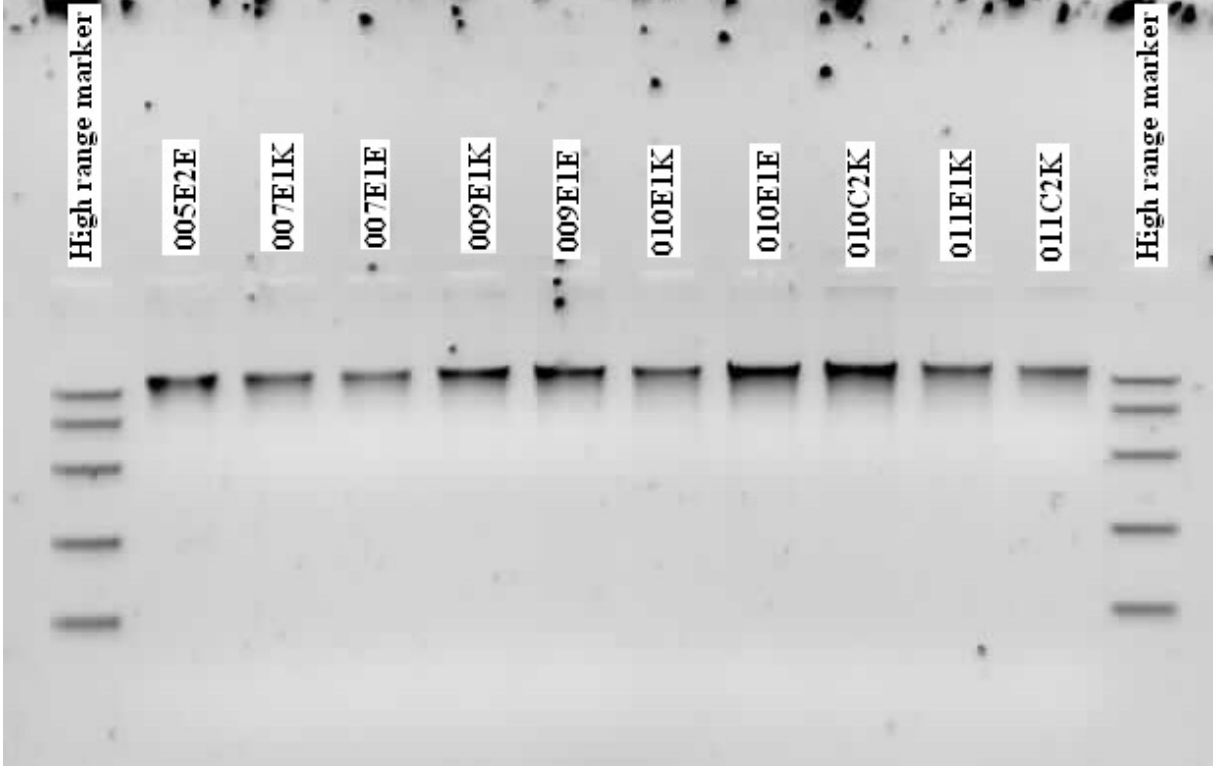
### **3.BULGULAR**

#### **3.1. Kan Örneklerinden DNA Eldesi ve Kalite Kontrolü**

Kan örneklerinden elde edilen DNA'ların varlığı ve kalitesi %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Varlığı saptanan DNA örnekleri PCR'da kalıp olarak kullanıldı.

Tablo 3.1.1: DNA örneklerinin spektrofotometre sonuçları:

<b>Hasta numarası</b>	<b>Konsantrasyon</b>	<b>OD 260/280</b>
<b>002C1E</b>	239 ng/ul	2,13
<b>004C1E</b>	73 ng/ul	2,05
<b>005C1E</b>	196 ng/ul	2,21
<b>015C1E</b>	207 ng/ul	2,11
<b>020C1E</b>	165 ng/ul	1,88
<b>021C1E</b>	87 ng/ul	1,96
<b>022C1E</b>	91 ng/ul	1,93
<b>023C1E</b>	110 ng/ul	1,91
<b>024C1E</b>	137 ng/ul	2,06
<b>025C1K</b>	127 ng/ul	1,94



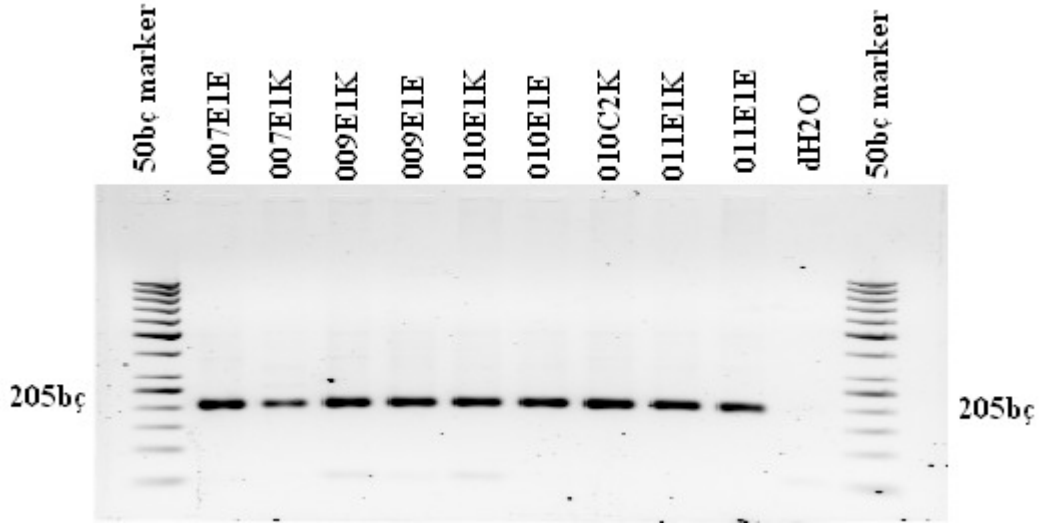
Şekil 3. 1.1: DNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü

### 3.2. PCR Ürünlerinin Kontrolüne Ait Bulgular

Elde edilen DNA örneklerinin PCR için uygun olup olmadığını saptamak amacıyla internal kontrol olarak  $\beta$ -actin geni kullanıldı. Bu gene özgü primerler kullanılarak kurulan PCR ürünleri DNA markerı( Fermentas SMO371) ile %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Aynı DNA'lar kullanılarak, PKHD1 geninin 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60 nolu ekzonlarına ait primerlerle ilgili gen bölgeleri PCR ile çoğaltıldı ve elde edilen ürünler %2'lik agaroz jelde DNA markerı eşliğinde yürütüldü(Şekil 3.2.1).



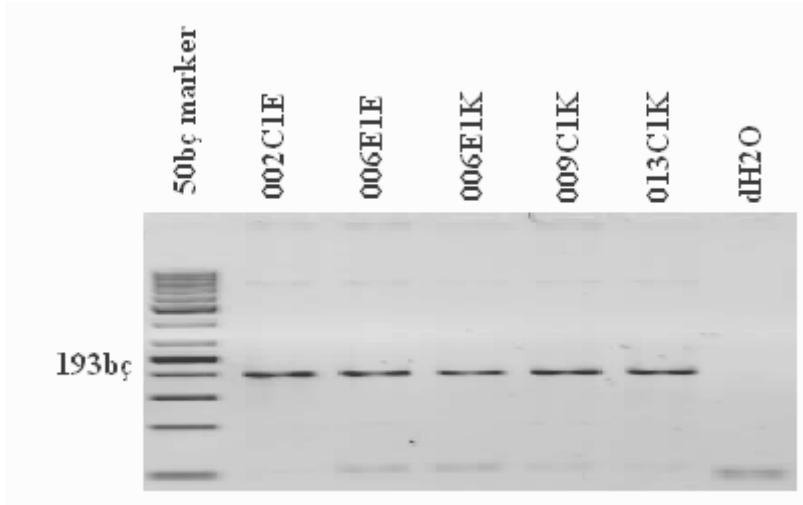
### Hastalara ait B-actin PCR Sonuçları



Şekil 3. 2. 1:  $\beta$ -actin(internal kontrol) PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

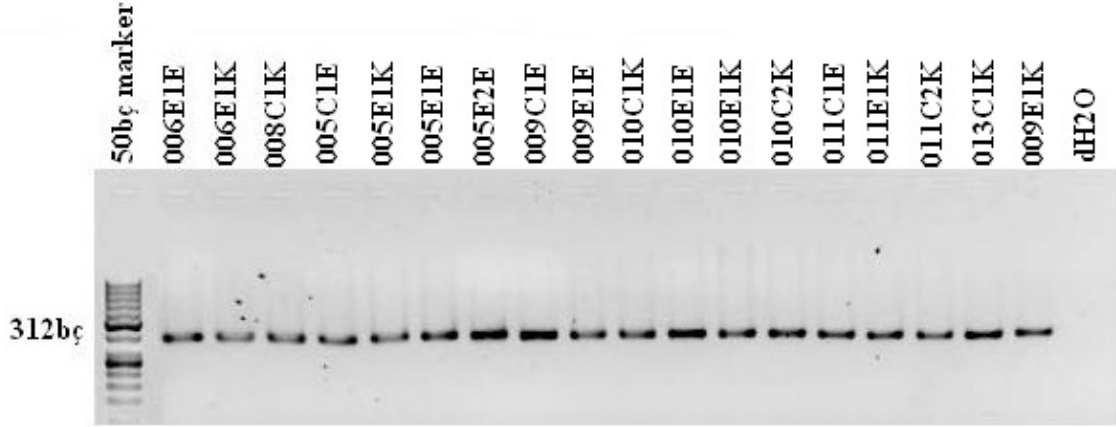
### 3.3. Otozomal Resesif Polikistik Böbrek Hastalarında PKHD1 Geninin 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60 nolu Ekzonlarındaki Mutasyonların DNA Dizi Analizi İle Taranması ve Saptanan Değişimler:

#### Ekzon 15 PCR sonuçları



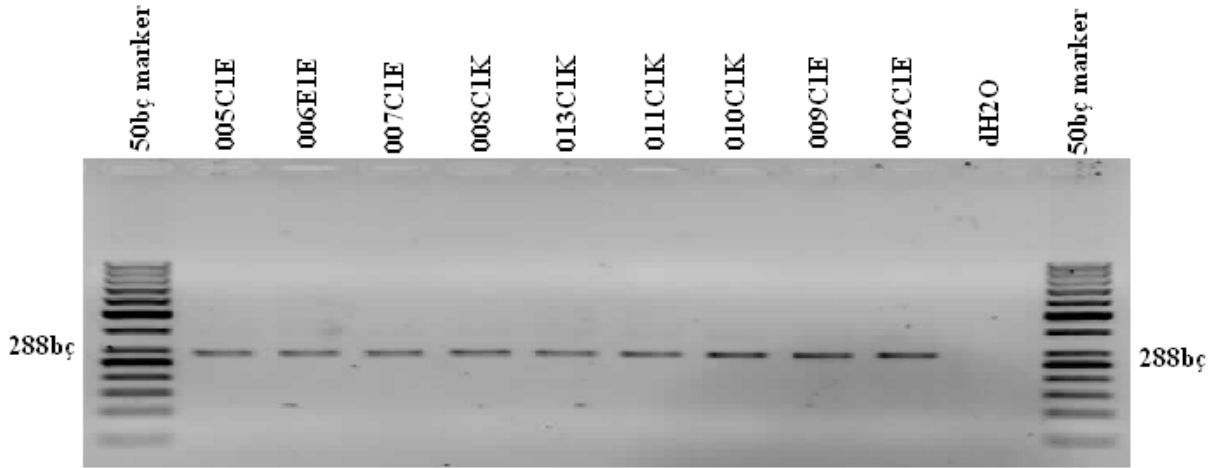
Şekil 3.3.1: 15.ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

### Ekzon 32A PCR Sonuçları



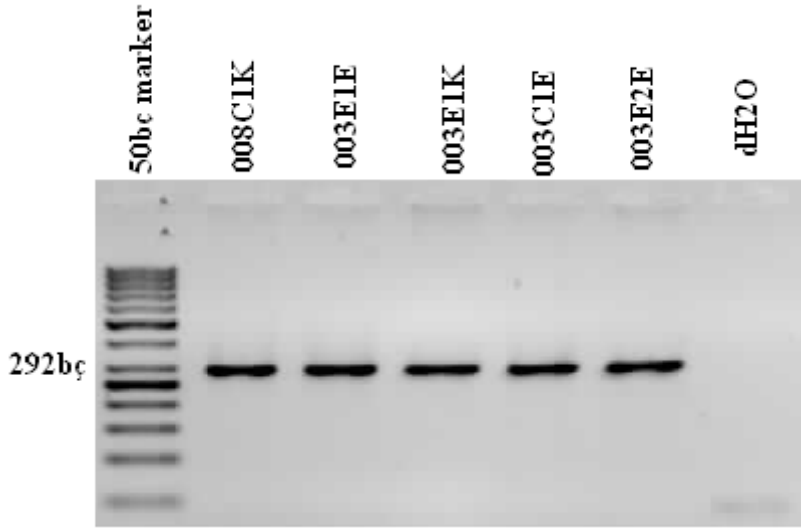
Şekil 3.3.2.: Ekzon 32A PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

### Ekzon 34 PCR Sonuçları



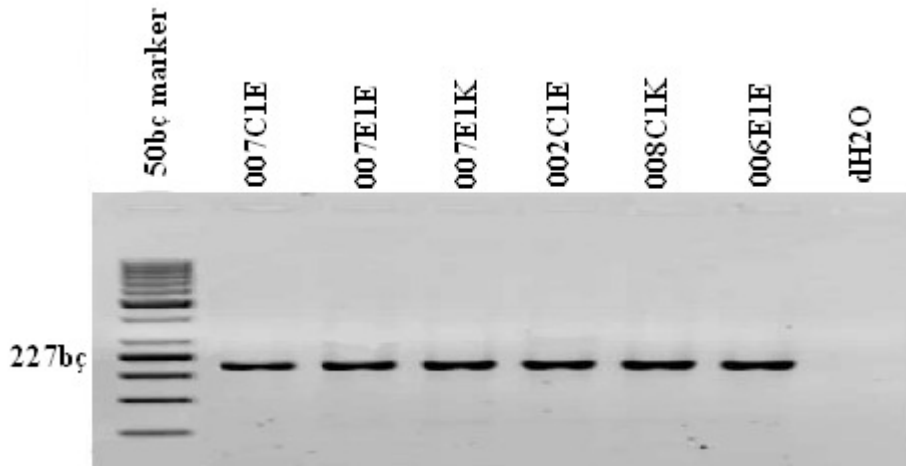
Şekil 3.3.3.: 34.ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

### Ekzon 58B PCR Sonuçları



Şekil 3.3.4.: Ekzon 58B PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

### Ekzon 60 PCR Sonuçları



Şekil 3. 3.5: 60.ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

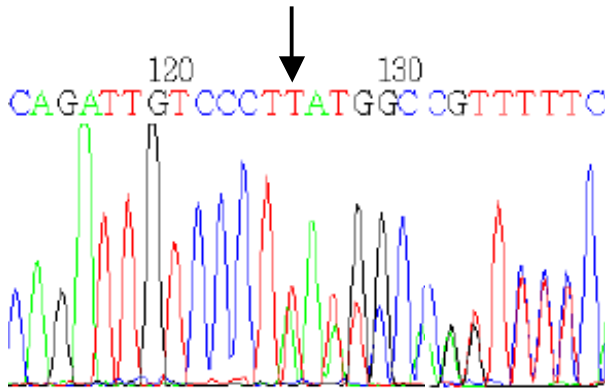
### 3.4. PKHD1 Genininin 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60 nolu Ekzonlarında Sekansların Eldesi

Agaroz jel elektroforezinde beklenen büyüklükte tek bant olarak gözlenen hastaların PCR örnekleri DNA dizi analizi için Macrogen firmasına gönderildi. DNA dizisindeki değişimleri saptamak amacıyla, örnekler ileri ve geri yönde primerler kullanılarak çalışıldı. Değişim saptanan hastaların ekzon bölgeleri PCR ile yeniden çoğaltılarak DNA dizi analizi için Macrogen firmasına gönderildi. Ek olarak ulaşılabildiğimiz ve gönüllü olan hastaların anne, baba ve kardeşleri de çalışmaya dahil edilerek elde edilen verilerin bir kez daha doğrulanması sağlandı.

PKHD1 geninin NCBI'da tanımlı NC\_000006 dizisi ile karşılaştırılan sekans sonuçlarına göre saptanan değişimler belirtilmiştir. Değişikliğın olduğu nükleotid üzerine ok işareti konularak gösterilmiştir.

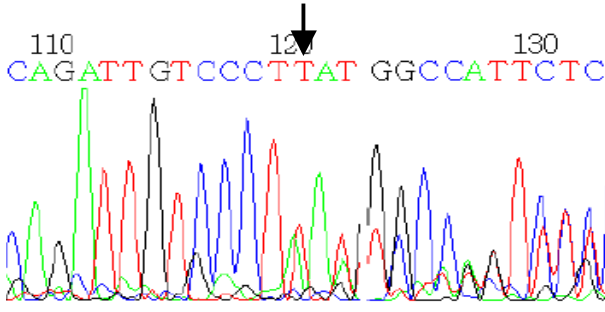
#### Şekil 3. 4. 1 Ekzon 14'te Mutasyon Saptanan Hastaların Sekans Sonuçları

035E1E ve 035E1K nolu bireyde literatürde tanımlı c.1068-1069dup P356fs mutasyonu heterozigot olarak saptandı.



Şekil 3. 4. 1. 1

14035E1E-F

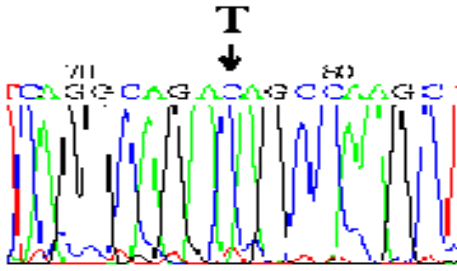


Şekil 3. 4. 1. 2

14035E1K-F

**Şekil 3. 4. 2: Ekzon 15'te saptanan SNP sonuçları**

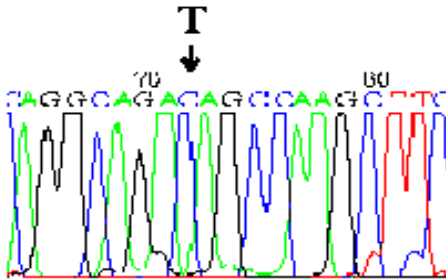
001C1K nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



Şekil 3. 4. 2. 1

15001C1K-(F)

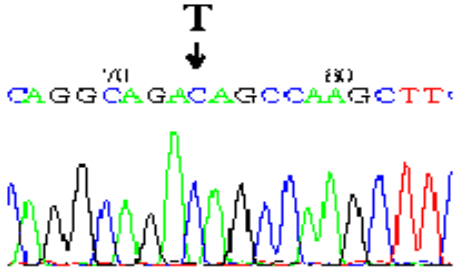
002C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



Şekil 3. 4. 2. 2

15002C1E-(F)

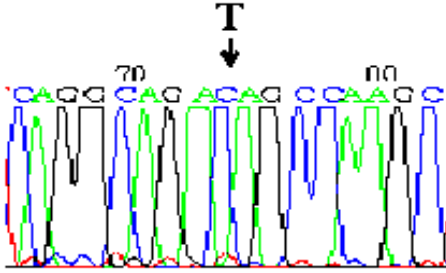
003C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 3

15003C1E-(F)

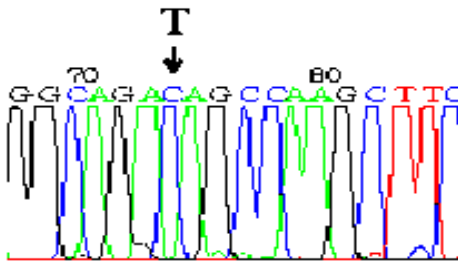
004C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 4

15004C1E-(F)

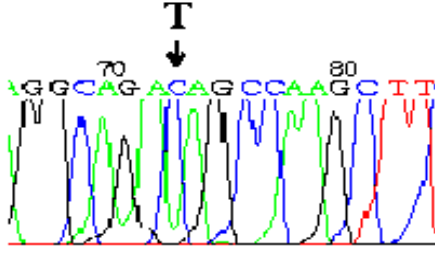
005C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 5

15005C1E-(F)

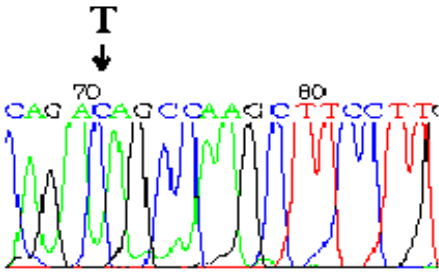
006E1E nolu ebeveyn için c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 6

15006E1E-(F)

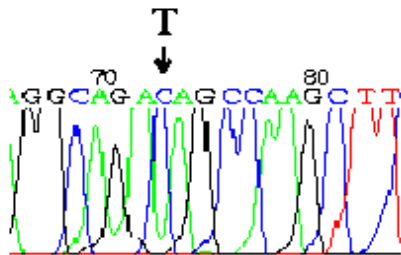
006E1K nolu ebeveyn için c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 7

15006E1K-(F)

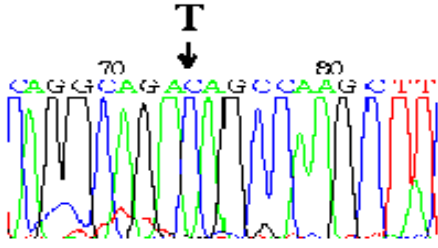
007C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 8

15007C1E-(F)

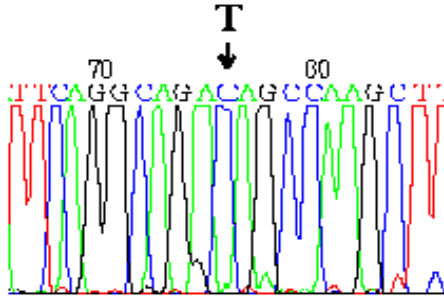
008C1K nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 9

15008C1K-(F)

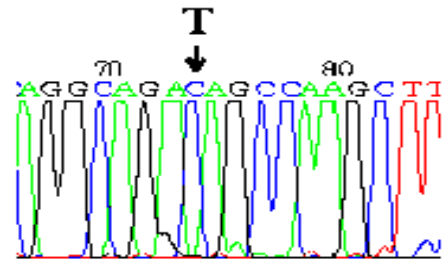
009C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 10

15009C1E-(F)

010C1K nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.

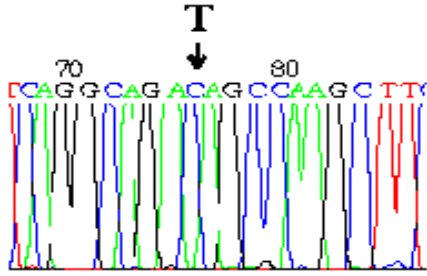


şekil 3. 4. 2. 11

15010C1K-(F)



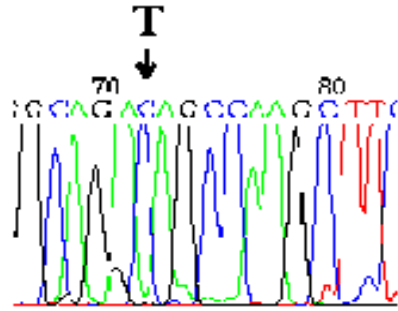
011C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 12

15011C1E-(F)

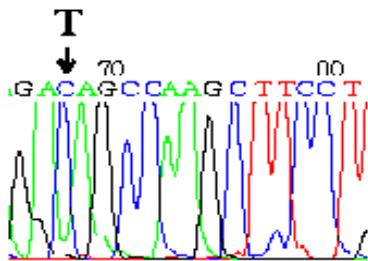
012C1K nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 13

15012C1K-(F)

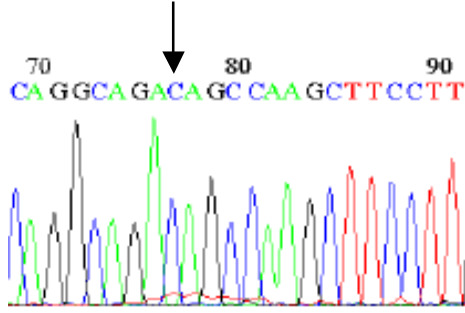
013C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 14

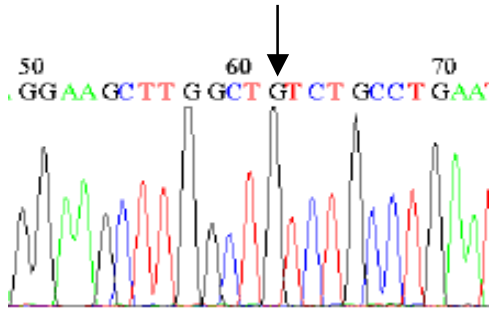
15013C1K-(F)

014C1K nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



Şekil 3. 4. 2. 15

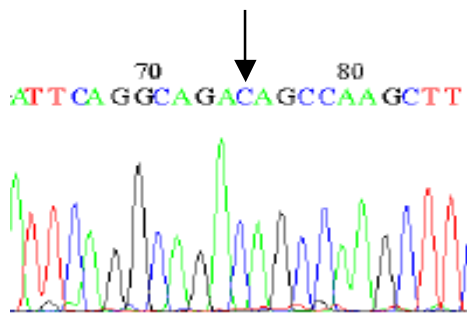
15014C1K-F



Şekil 3. 4. 2. 16

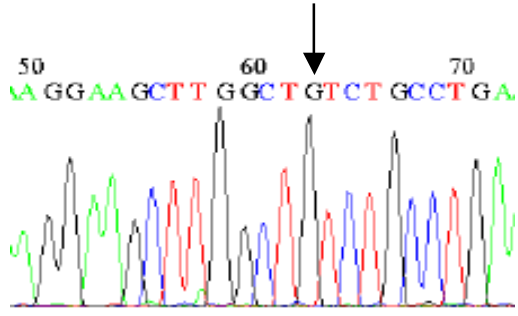
15014C1K-R

015C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



Şekil 3. 4. 2. 17

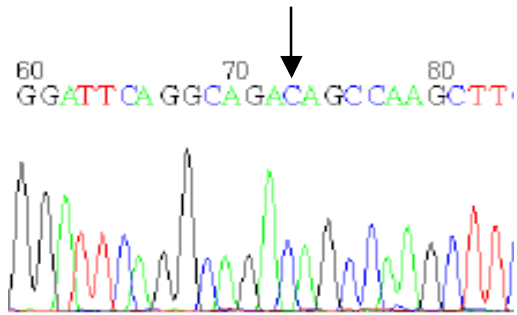
15015C1E-F



Şekil 3. 4. 2. 18

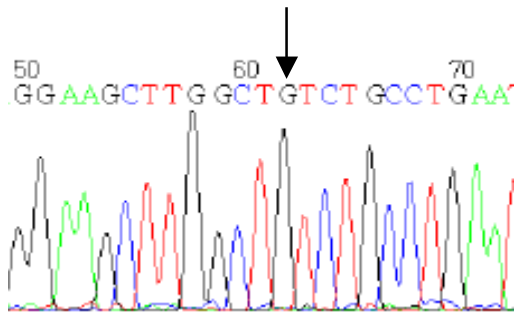
15015C1E-R

016C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



Şekil 3. 4. 2. 19

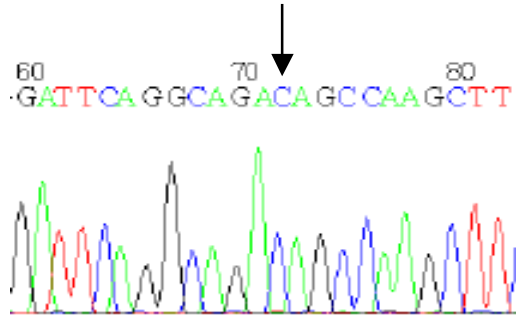
15016C1E-F



Şekil 3. 4. 2. 20

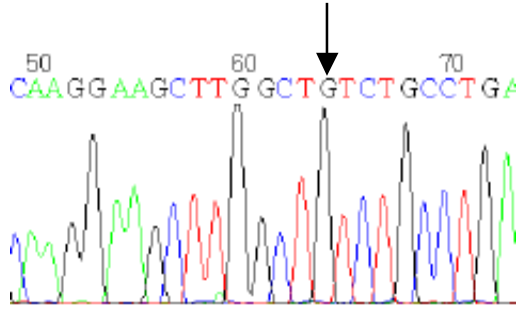
15016C1E-R

017C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 21

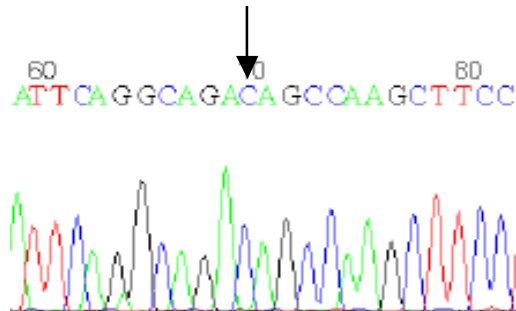
15017C1E-F



şekil 3. 4. 2. 22

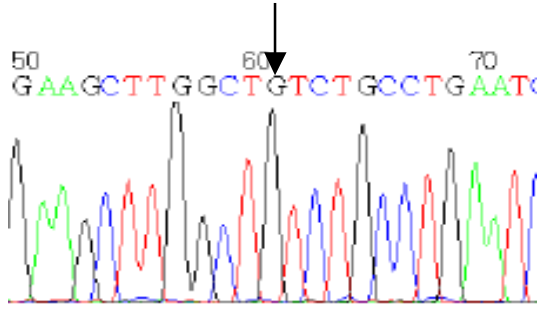
15017C1E-R

018C1K nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 23

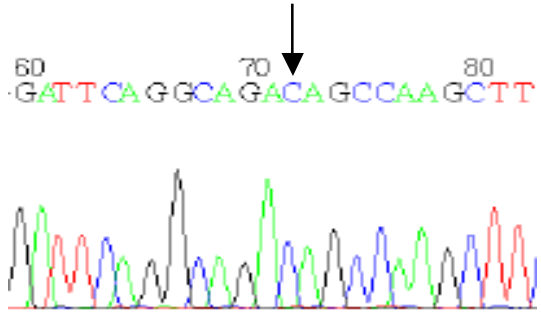
15018C1K-F



Şekil 3. 4. 2. 24

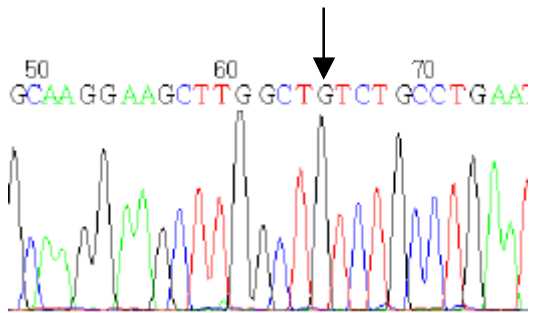
15018C1K-R

019C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



Şekil 3. 4. 2. 25

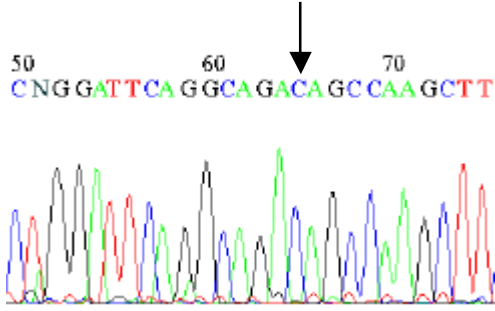
15019C1E-F



Şekil 3. 4. 2. 26

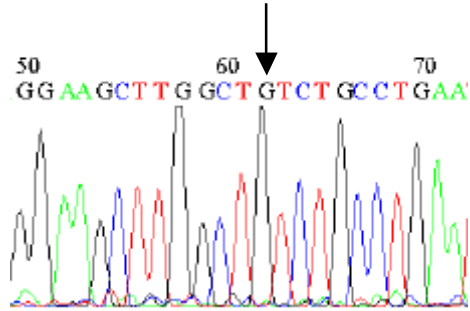
15019C1E-P15-R

020C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 27

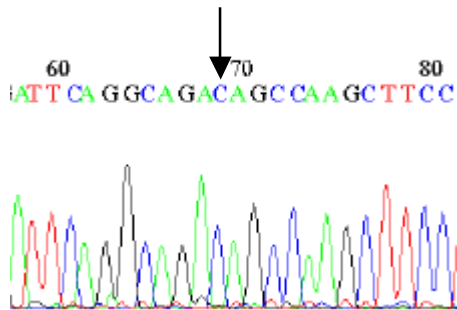
15020C1E-F



şekil 3. 4. 2. 28

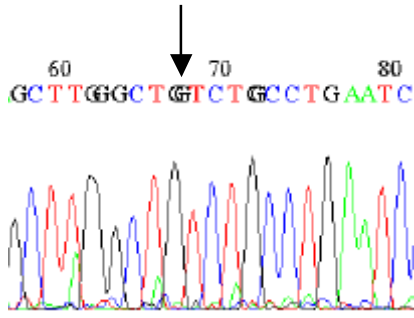
15020C1E-R

021C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



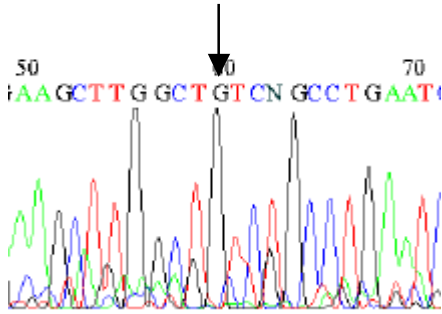
şekil 3. 4. 2. 29

15021C1E-F



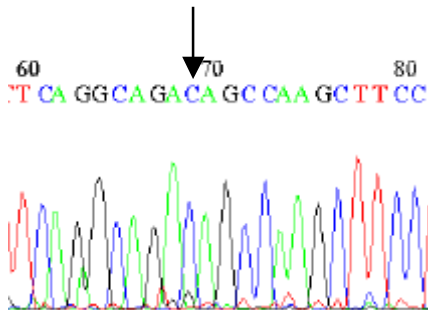
Şekil 3. 4. 2. 30  
15021C1E-R

022C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



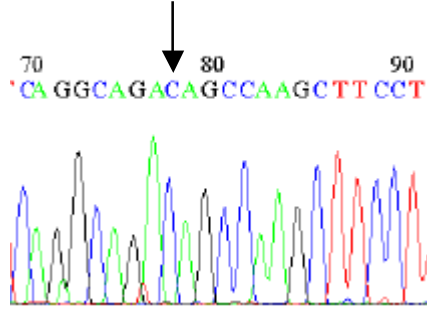
Şekil 3. 4. 2. 31  
15022C1E-R

023C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



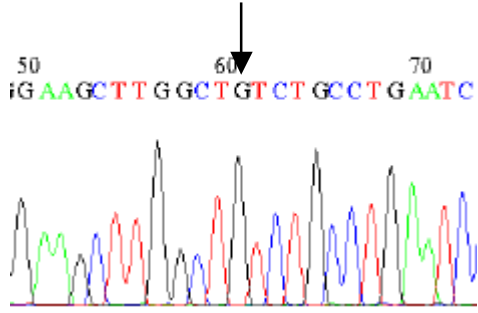
Şekil 3. 4. 2. 32  
15023C1E-F

024C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 33

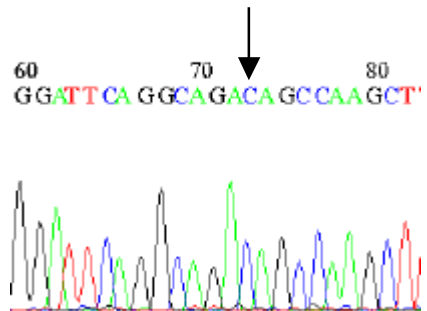
15024C1E-F



şekil 3. 4. 2. 34

15024C1E-P15-R

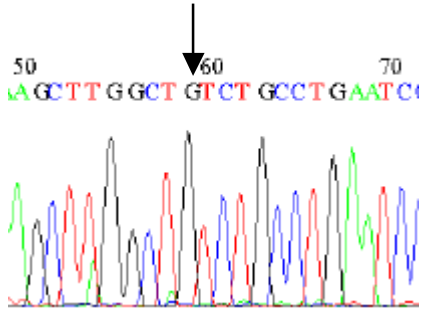
025C1K nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 35

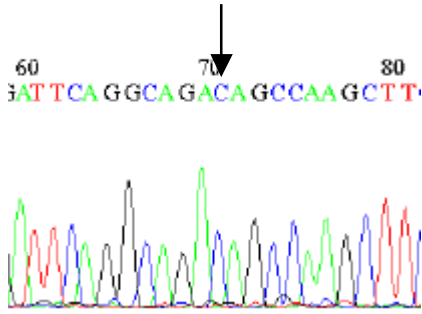
15025C1K-F



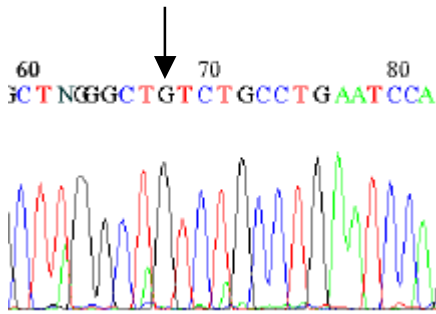


Şekil 3. 4. 2. 36  
15025C1K-P15-R

026C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.

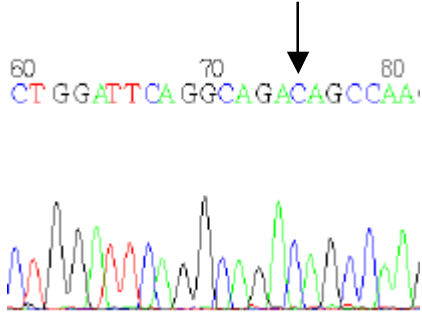


Şekil 3. 4. 2. 37  
15026C1E-F



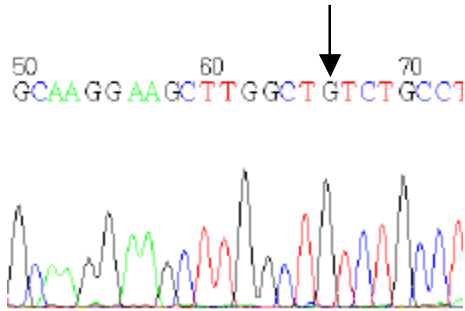
Şekil 3. 4. 2.38  
15026C1E-R

028C1K nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 39

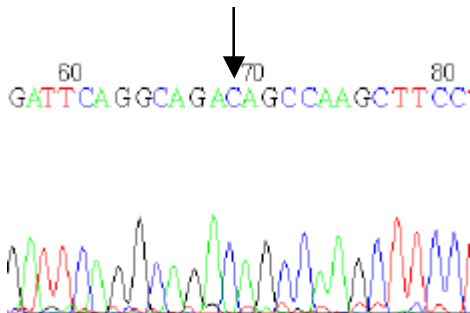
15028C1K-F



şekil 3. 4. 2. 40

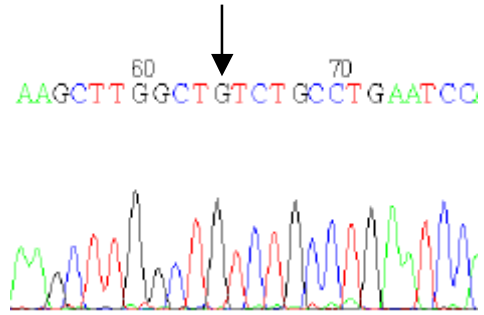
15028C1K-R

030C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur



Şekil 3. 4. 2. 41

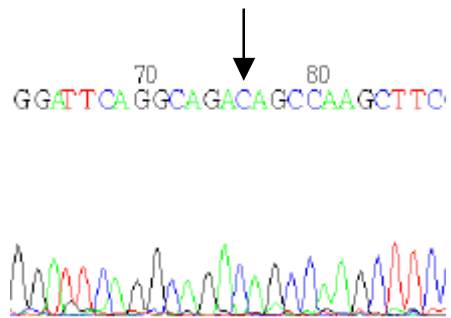
15030C1E-F



Şekil 3. 4. 2. 42

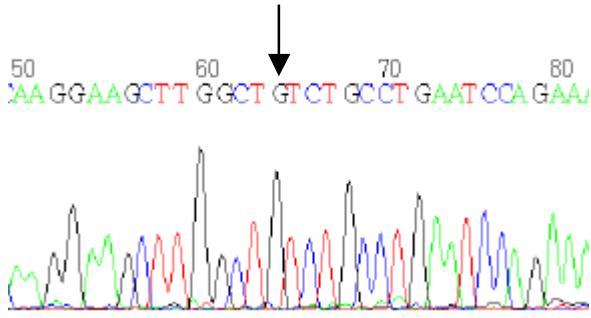
15030C1E-R

031C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur



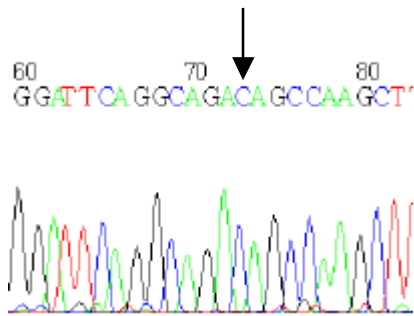
Şekil 3. 4. 2. 43

15031C1E-F

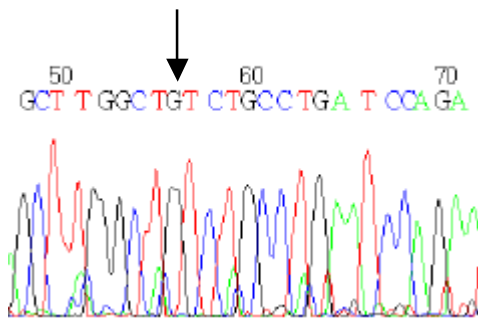


Şekil 3. 4. 2.45  
 15031C1E-R

033C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.

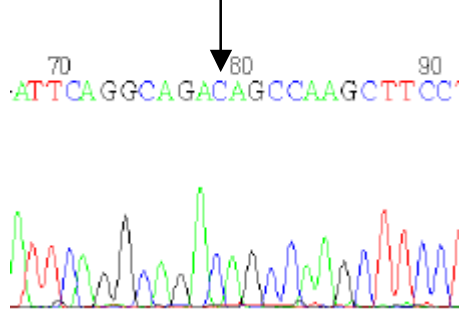


Şekil 3. 4. 2. 46  
 15033C1E-F



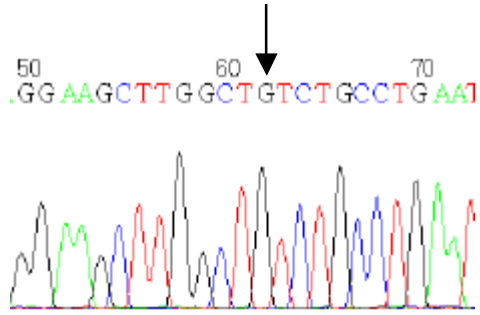
Şekil 3. 4. 2. 47  
 15033C1E-R

034C1E nolu hastada c.1185C>T D395D değişimi homozigottur.



şekil 3. 4. 2. 48

15034C1E-F

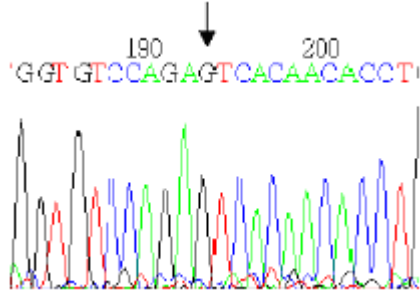


şekil 3. 4. 2. 49

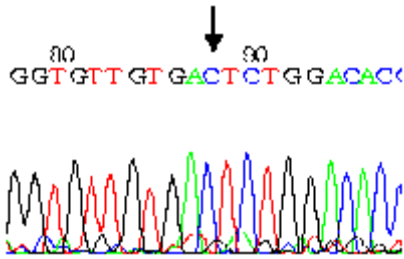
15034C1E-R

### Şekil 3. 4. 3 Ekzon 16'da mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları

017C1E nolu hastada literatürde tanımlı c.1418T>G I473S mutasyonu homozigottur.

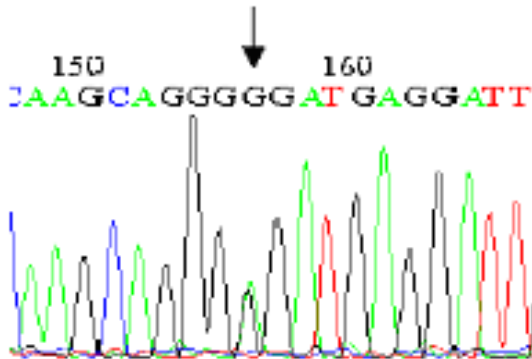


Şekil 3. 4. 3. 1  
16017C1E-F

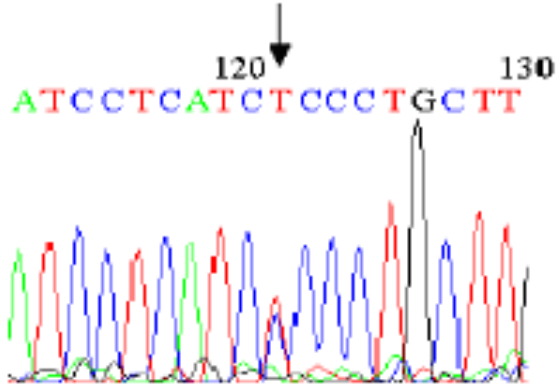


Şekil 3. 4. 3. 2  
16017C1E-R

023C1E nolu hastada literatürde tanımlı c.1397G>C G466A mutasyonu heterozigottur.



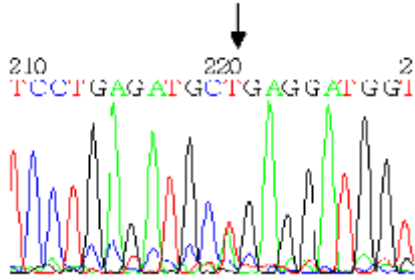
Şekil 3. 4. 3. 3  
16023C1E-P16-F



Şekil 3. 4. 3. 4  
16023C1E-R

### Şekil 3. 4. 4 Ekzon 32A da saptanan değişimler

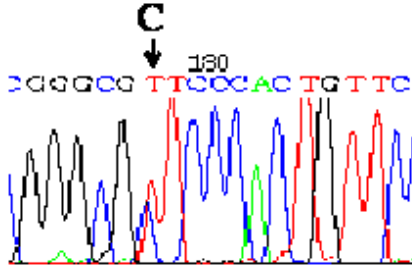
016C1E nolu hastada c.3643 literatürde tanımlı olmayan A>T I1215F mutasyonu heterozigot olarak saptanmıştır.



Şekil 3. 4. 4. 1  
32A016C1E-R

### Şekil 3. 4. 5: Ekzon 32A'da saptanan SNP sonuçları

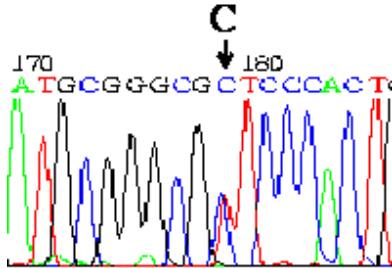
001C1K nolu hastada A1262V değişimi heterozigottur.



Şekil 3. 4. 5. 1

32A001C1K-(R)

004C1E nolu hastada A1262V değişimi heterozigottur.

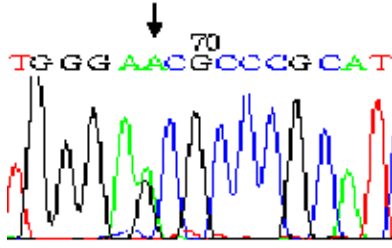


Şekil 3. 4. 5. 2

32A004C1E-(R)

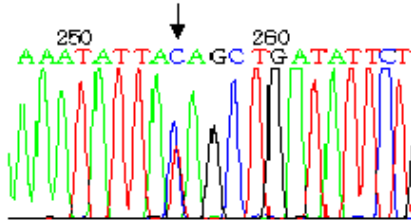
005C1E nolu hastada A1262V değişimi heterozigottur.





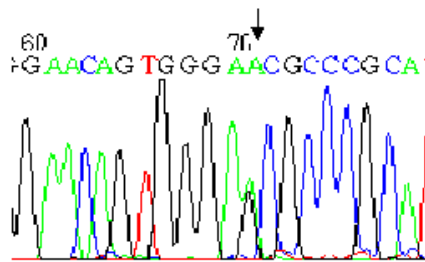
Şekil 3. 4. 5. 3  
32A005C1E-(R)

005C1E nolu hastada c.3629-32A>G intronik değişimi heterozigottur.



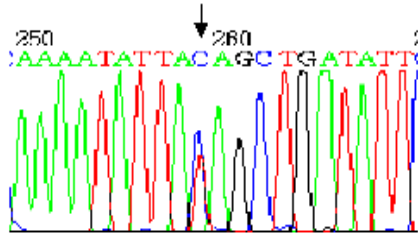
Şekil 3. 4. 5. 4  
32A005C1E-(R)

006E1E nolu ebeveynde A1262V değişimi heterozigottur.



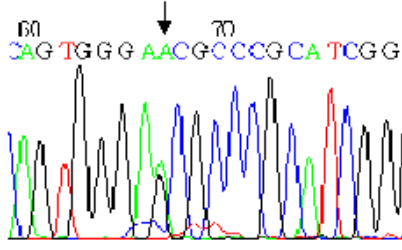
Şekil 3. 4. 5. 5  
32A006E1E-(R)

006E1E nolu ebeveynde c.3629-32A>G intronik değişimi heterozigottur.



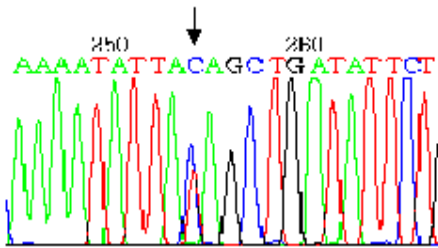
Şekil 3. 4. 5. 6  
32A006E1E-(R)

006E1K nolu ebeveynde A1262V değişimi heterozigottur.



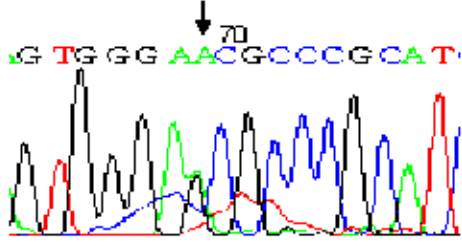
Şekil 3. 4. 5. 7  
32A006E1E-(R)

006E1K nolu ebeveynde c.3629-32A>G intronik değişimi heterozigottur.



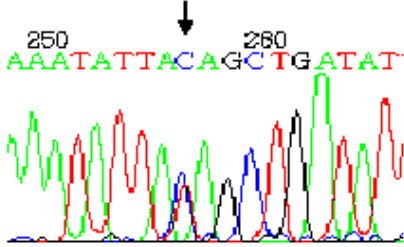
Şekil 3. 4. 5. 8  
32A006E1K-(R)

007C1E nolu hastada A1262V değişimi heterozigottur.



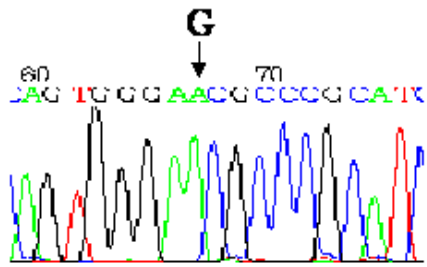
Şekil 3. 4. 5. 9  
32A007C1E-(R)

007C1E nolu hastada c.3629-32A>G intronik değişimi heterozigottur.



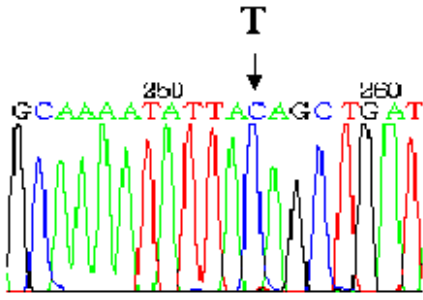
Şekil 3. 4. 5. 10  
32A007C1E-(R)

008C1K nolu hastada A1262V değişimi homozigottur.



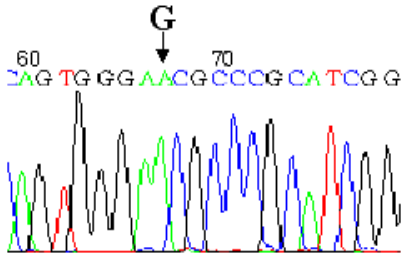
Şekil 3. 4. 5. 11  
32A008C1K-(R)

008C1K nolu hastada c.3629-32A>G intronik değişimi homozigottur.



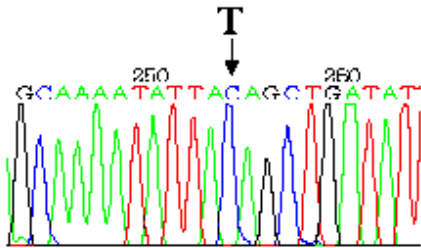
Şekil 3. 4. 5. 12  
32A008C1K-(R)

009C1E nolu hastada A1262V değişimi homozigottur.



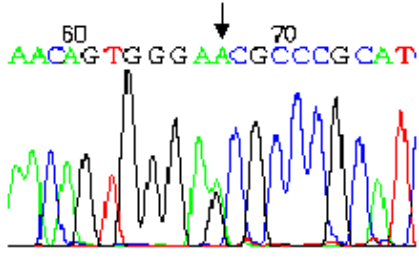
Şekil 3. 4. 5. 13  
32A009C1E-(R)

009C1E nolu hastada c.3629-32A>G intronik değişimi homozigottur.



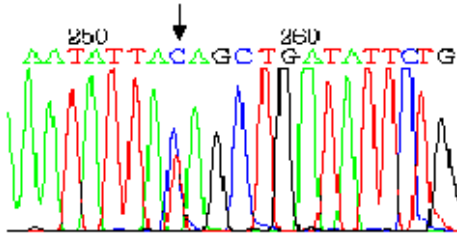
Şekil 3. 4. 5. 14  
32A009C1E-(R)

010C1K nolu hastada A1262V değişimi heterozigottur.



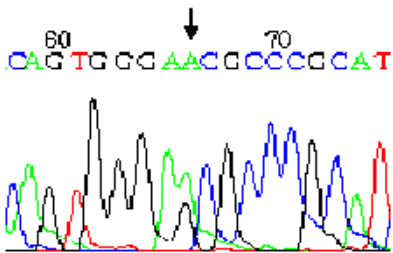
Şekil 3. 4. 5. 15  
32A010C1K-(R)

010C1K nolu hastada c.3629-32A>G intronik değişimi heterozigottur.



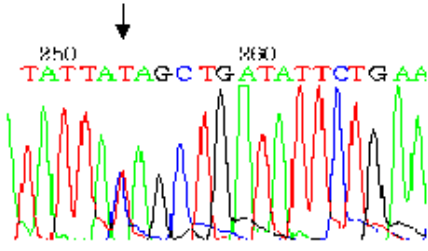
Şekil 3. 4. 5. 16  
32A010C1K-(R)

011C1E nolu hastada A1262V değişimi heterozigottur.



Şekil 3. 4. 5. 17  
32A011C1E-(R)

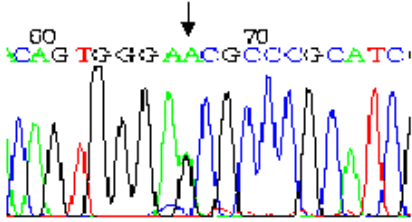
011C1E nolu hastada c.3629-32A>G intronik değişimi heterozigottur.



Şekil 3. 4. 5. 18

32A011C1E-(R)

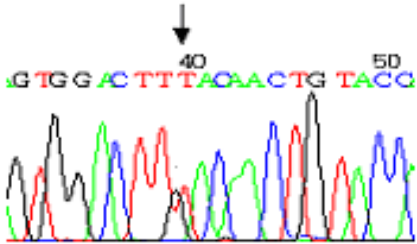
013C1K nolu hastada A1262V değişimi heterozigottur.



Şekil 3. 4. 5. 19

32A013C1K-(R)

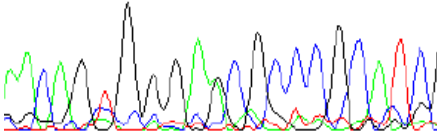
013C1K nolu hastada c.3629-32A>G intronik değişimi heterozigottur.



Şekil 3. 4. 5. 20

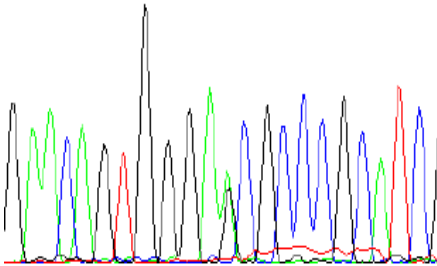
32A013C1K-(R)

70                      80  
AACAGTGGGAACGCCCGCATC

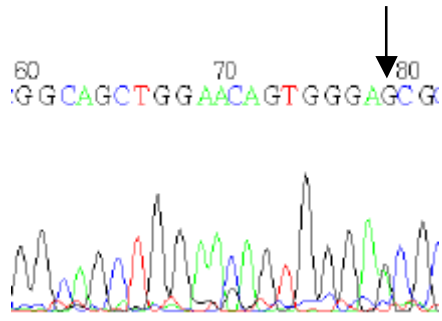


Şekil 3. 4. 5. 21  
32A014C1K-P32A-R

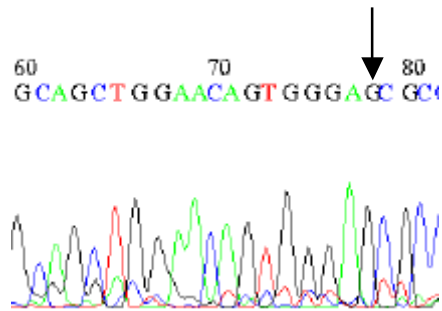
60                      70                      80  
GAACAGTGGGAACGCCCGCATC



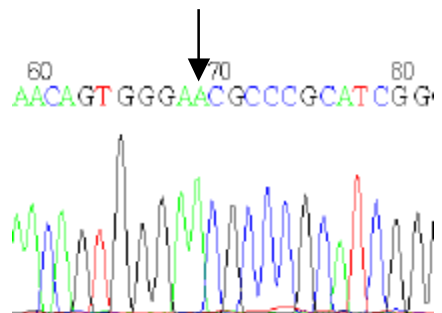
Şekil 3. 4. 5. 22  
32A015C1E-P32A-R



Şekil 3. 4. 5. 23  
 32A016C1E-P32A-R

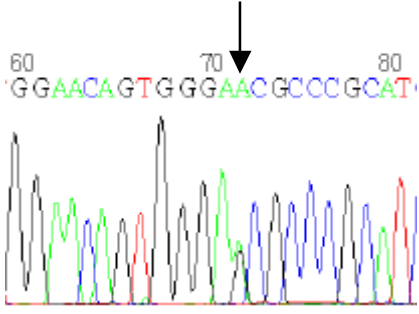


Şekil 3. 4. 5. 24  
 32A017C1E-P32A-R



Şekil 3. 4. 5. 25  
 32A018C1K-P32A-R



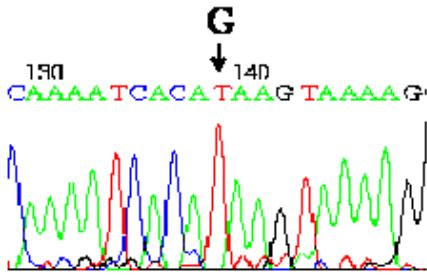


Şekil 3. 4. 5. 26

32A019C1E-P32A-R

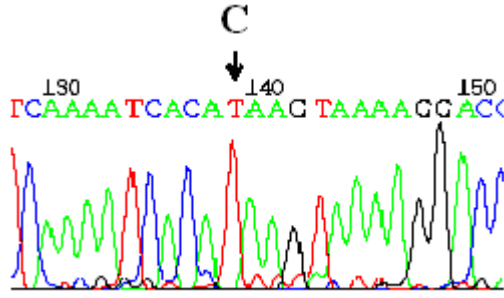
**Şekil 3. 4. 6: Ekzon 32C’de mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları**

008C1K nolu hasta litaretürde tanımlı c.4292 G>C C1431S nolu mutasyonu homozigot olarak taşımaktadır.



Şekil 3. 4. 6. 1

32C008C1K-(F)

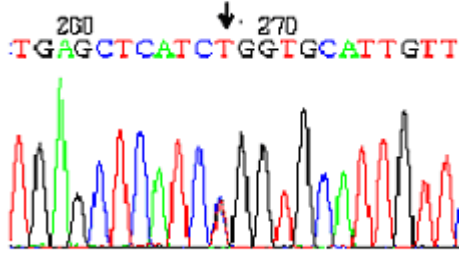


Şekil 3. 4. 6. 2

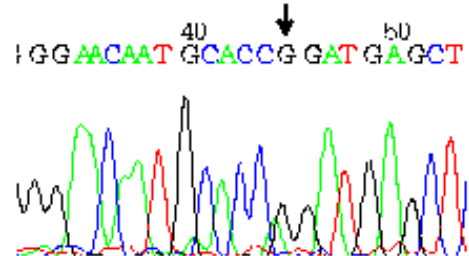
32C008C1K-(R)

### Şekil 3. 4. 7: Ekzon 32E'de mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları

002C1E ve 007C1E nolu hastalarda litaretürde tanımlı c.4870 C>T R1624W nolu mutasyonu heterozigot olarak bulunmaktadır.

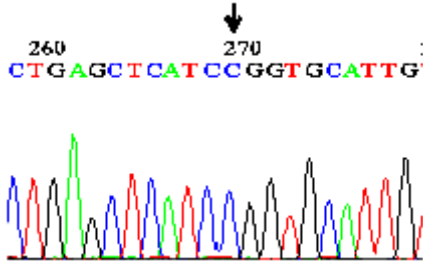


Şekil 3. 4. 7. 1  
32E002C1E-(F)

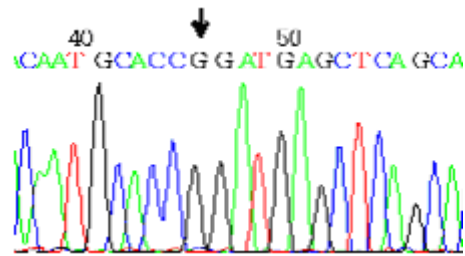


Şekil 3. 4. 7. 2  
32E002C1E-(R)

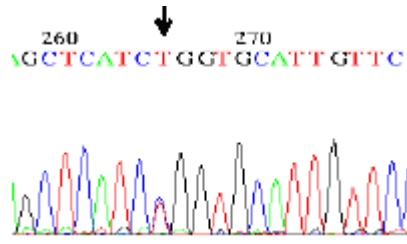
002C1E nolu hastanın babası 002E1E, bu mutasyon açısından normaldir. Hastanın annesi 002E1K, litaretürde tanımlı R1624W nolu mutasyonu heterozigot olarak bulunmaktadır.



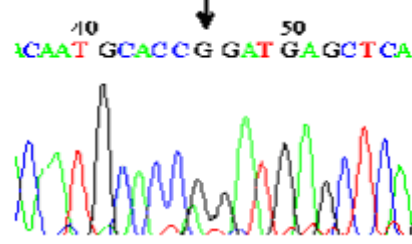
Şekil 3. 4. 7. 3  
32E002E1E-(F)



Şekil 3. 4. 7. 4  
32E002E1E-(R)

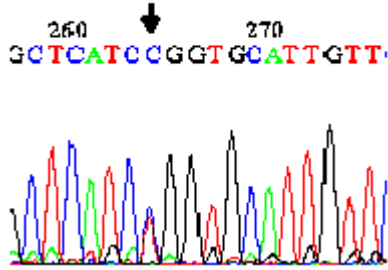


Şekil 3. 4. 7. 5  
32E002E1K-(F)

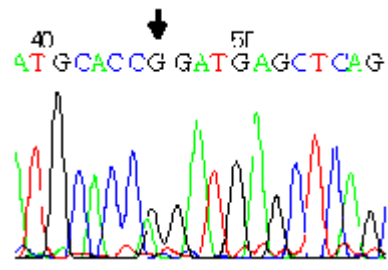


Şekil 3. 4. 7. 6  
32E002E1K-(R)

007C1E nolu hasta literatürde tanımlı c.4870 C>T R1624W mutasyonunu hetrozigot olarak taşımaktadır.

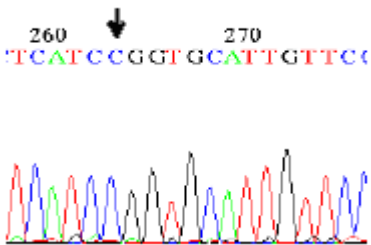


Şekil 3. 4. 7. 7  
32E007C1E-(F)

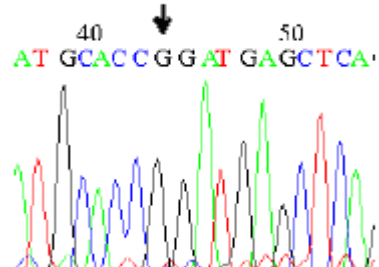


Şekil 3. 4. 7. 8  
32E007C1E-(R)

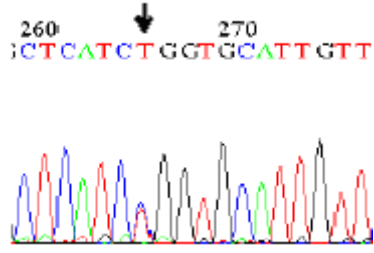
007C1E nolu hastanın babası 007E1E, bu mutasyon açısından normaldir. Hastanın annesi 007E1K, literatürde tanımlı c.4870 C>T R1624W nolu mutasyonu heterozigot olarak bulunmaktadır.



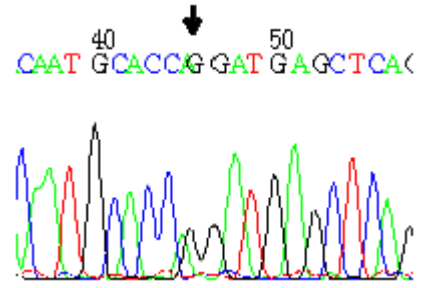
Şekil 3. 4. 7. 9  
32E007E1E-(F)



Şekil 3. 4. 7. 10  
32E007E1E-(R)

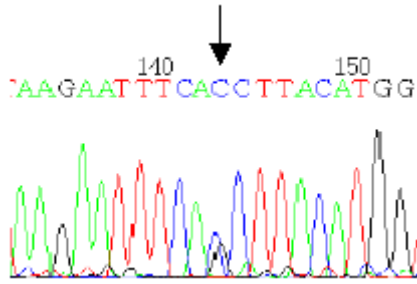


Şekil 3. 4. 7. 11  
 32E007E1K-(F)

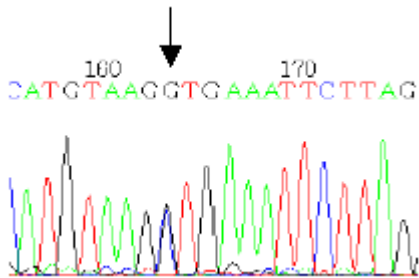


Şekil 3. 4. 7. 12  
 32E007E1K-(R)

019C1E nolu hastada literatürde tanımlı olmayan c.4751G>C S1589T mutasyonu heterozigot olarak saptandı.



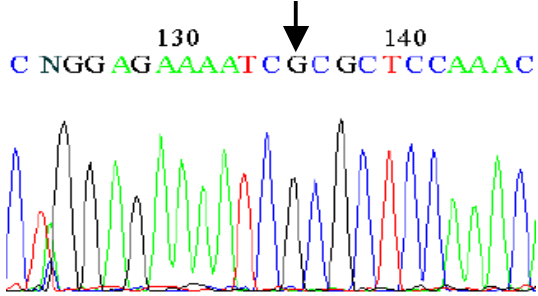
Şekil 3. 4. 7. 13  
 32E019C1E-F



Şekil 3. 4. 7. 14  
 32E019C1E-R

### Şekil 3. 4. 8 Ekzon 33'te mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları

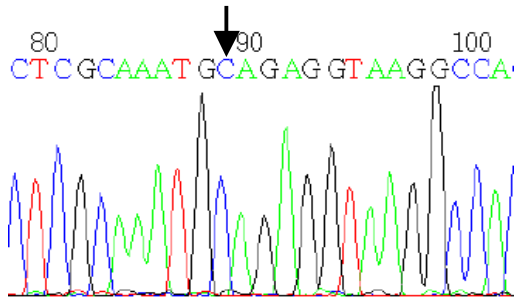
025C1K nolu hastada literatürde tanımlı olmayan c.5275G>C A1780F mutasyonu



Şekil: 3. 4. 8. 1  
33025C1K-R

### Şekil 3. 4. 9 Ekzon 34'te mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları

029C1K nolu hastada literatürde tanımlı olmayan c.5457T >G V1817G mutasyonu homozigot olarak saptandı.

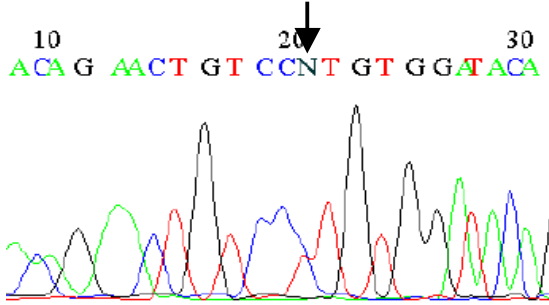


Şekil: 3 4. 9. 1.  
34029C1K-R

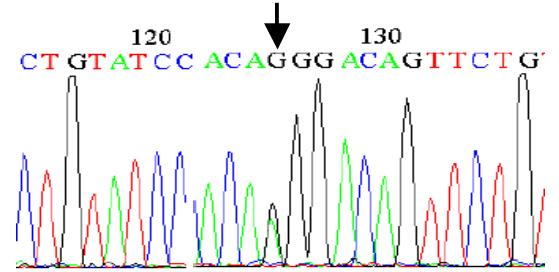
### Şekil 3. 4. 10 Ekzon 53'te mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları

023C1E nolu hastada literatürde tanımlı olan c.8315T>C I2772P mutasyonu

heterozigot olarak saptandı.



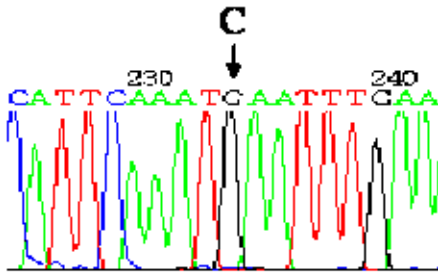
Şekil 3. 4. 10. 1  
53023C1E-P53-F



Şekil 3. 4. 10. 2  
53023C1E-P53-R

### Şekil 3. 4. 11: Ekzon 54'te saptanan SNP sonuçları

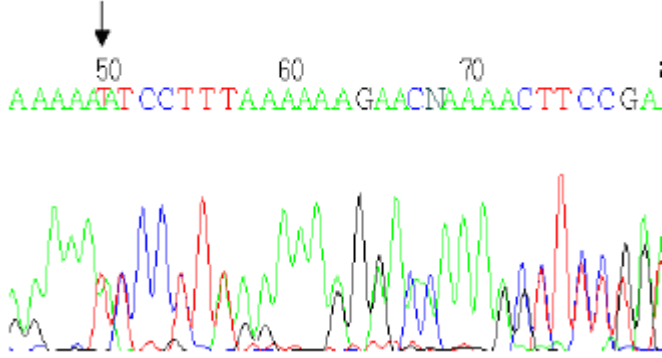
007C1E nolu hastada c.8441-32 G>C intronik değişimi homozigot olarak saptanmıştır.



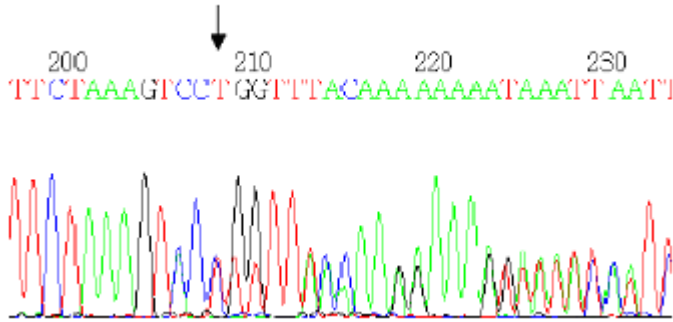
Şekil 3. 4. 11. 1  
54007C1E-(F)

### Şekil 3. 4. 12: Ekzon 54'te saptanan mutasyon sonuçları

Literatürde tanımlı olmayan c.8442delT değişimi 016C1E nolu hastada heterozigot olarak saptanmıştır.



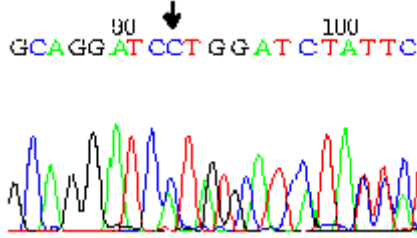
Şekil: 3. 4. 12. 1  
54016C1E-P54-F



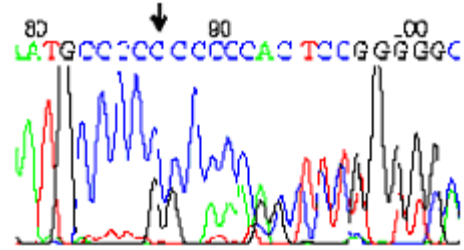
Şekil: Şekil: 3. 4. 12. 2  
54016C1E-P54-R

### Şekil 3. 4. 13 Ekzon 58A'da mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları

007C1E nolu hastada literatürde tanımlı olmayan c.9076delC G3026fs mutasyonunu heterozigot olarak taşımaktadır.

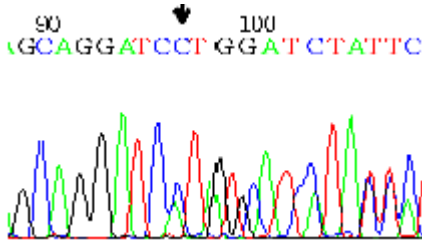


Şekil 3. 4. 13. 1  
58A007C1E-(F)

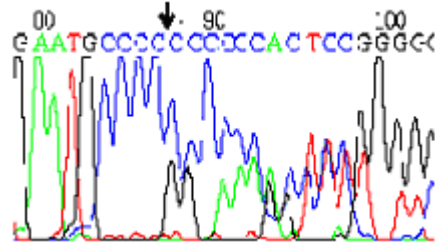


Şekil 3. 4. 13. 2  
58A007C1E-(R)

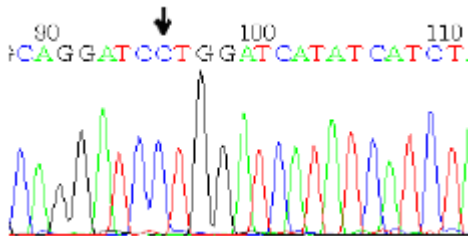
007C1E nolu hastanın babası 007E1E, literatürde tanımlı olmayan G3026fs nolu mutasyonu heterozigot olarak bulunmaktadır. Hastanın annesi, 007C1K bu mutasyon için normaldir.



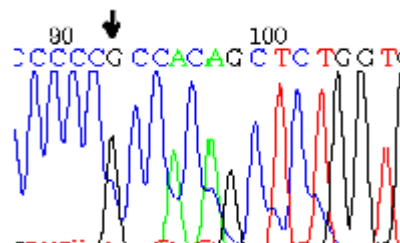
Şekil 3. 4. 13. 3  
58A007E1E-(F)



Şekil 3. 4. 13. 4  
58A007E1E-(R)



Şekil 3. 4. 13. 5  
58A007E1K-(F)

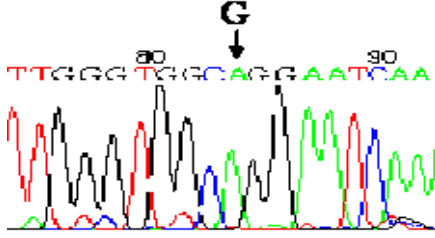


Şekil 3. 4. 13. 6  
58A007E1K-(R)



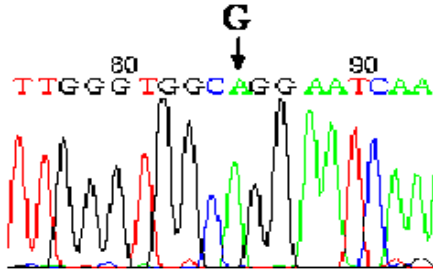
### Şekil 3. 4. 14: Ekzon 58B’de saptanan SNP sonuçları

002C1E nolu hastada A309A değişimi homozigot olarak saptandı.



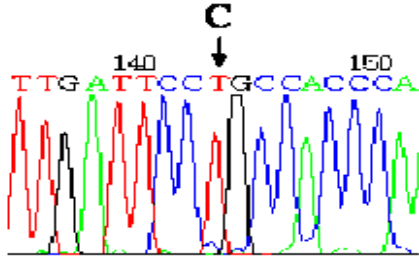
Şekil 3. 4. 14 1  
58B002C1E-(F)

003C1E nolu hastada A309A değişimi homozigot olarak saptandı.



Şekil 3. 4. 14 . 2  
58B003C1E-(F)

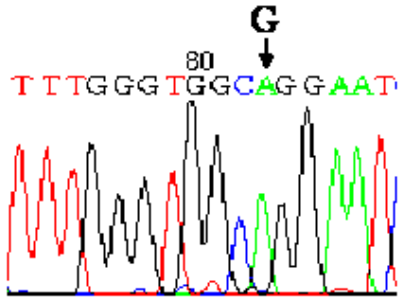
007C1E nolu hastada A309A değişimi homozigot olarak saptandı.



Şekil 3. 4. 14. 3

58B007C1E-(F)

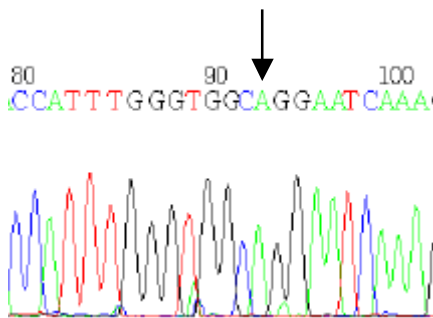
008C1K nolu hastada A309A değişimi homozigot olarak saptandı.



Şekil 3. 4. 14. 4

58B008C1K-(F)

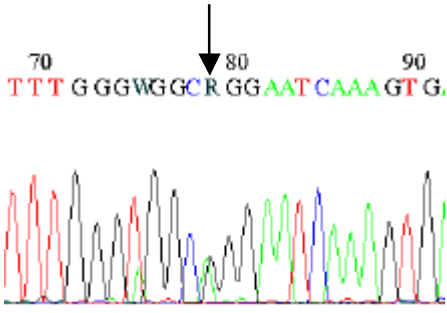
018C1K nolu hastada A309A değişimi homozigot olarak saptandı.



Şekil 3. 4. 14. 5

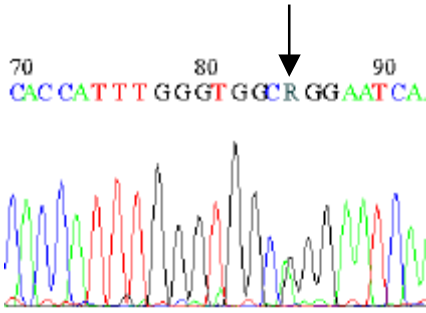
58B018C1K-F

020C1E nolu hastada A309A değişimi heterozigot olarak saptandı.



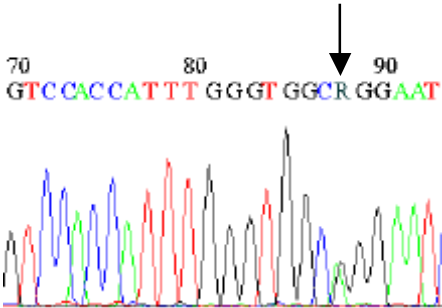
Şekil 3. 4. 14 6  
 58B020C1E-F

021C1K nolu hastada A309A değişimi heterozigot olarak saptandı.



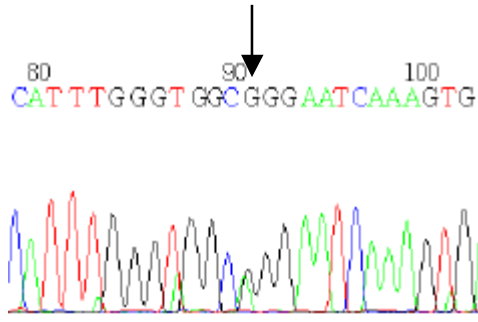
Şekil 3. 4. 14. 7  
 58B021C1E-F

022C1E nolu hastada A309A değişimi heterozigot olarak saptandı.



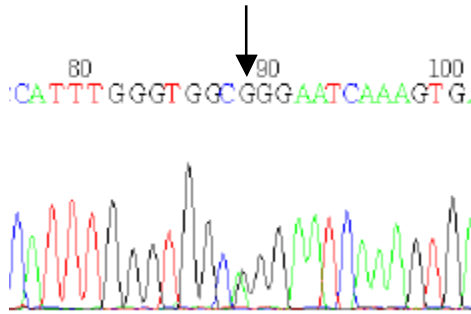
Şekil 3. 4. 14. 8  
 58B022C1E--F

035E1E nolu hastada A309A değişimi heterozigot olarak saptandı.



Şekil 3. 4. 14. 9  
 58B035E1E—F

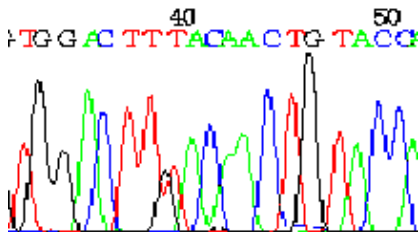
035E1K nolu hastada A309A değişimi heterozigot olarak saptandı.



Şekil 3. 4. 14. 10  
 58B035E1K-F

**Şekil 3. 4. 15: Ekzon 58C’de saptanan SNP sonuçları**

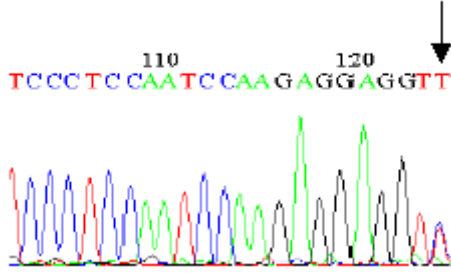
006E1K nolu ebeveyde D3139Y değişimi heterozigot olarak saptandı.



Şekil 3. 4. 15. 1  
 58C006E1K-(F)

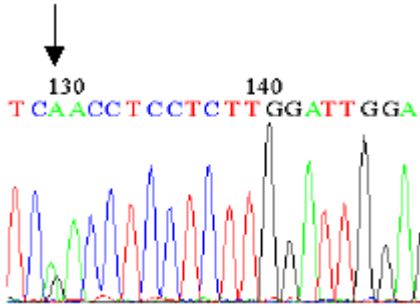
**Şekil 3. 4. 16: Ekzon 58D’de mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları**

022C1E nolu bireyde literatürde tanımlı nonsens c.9718C>T R3240X mutasyonu heterozigot olarak saptandı.



Şekil: 3. 4. 16. 1

58D022C1E-(F)



Şekil: 3. 4. 16. 2

58D022C1E-(F)

Tablo : 3. 3. 1 Otozomal Resesif Polikistik Böbrek Hastalarında PKHD1 Geninin 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60 nolu Ekzonlarındaki Mutasyonların DNA Dizi Analizi İle Taranması ve Saptanan Değişimler

### PKHD1 Geni EKZON NO

Hasta No	14	15	16	32A	32B	32C	32D	32E	32F	32G	33	34	53	54	58A	58B	58C	58D	60
001C1K	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
002C1E	X	1	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X	X	X	X	1	X	X	X
003C1E	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	1	X	X	X
004C1E	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
005C1E	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
				1															
006E1E	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
				1															
006E1K	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	1	X	X
				1															
007C1E	X	1	X	1	X	X	X	1	X	X	X	X	X	1	1	1	X	X	X
				1															
008C1K	X	1	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	1	X	X	X
				1															
009C1E	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
				1															
010C1K	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
				1															
011C1E	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
				1															
012C1K	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
013C1K	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
				1															
014C1K	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
				1															
015C1E	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
				1															
016C1E	X	1	X	1	X	X	X	X		X	X	X	X	1	X	X	X	X	X
				1															
017C1E	X	1	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
				1															
018C1K	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	1	X	X	X
				1															
019C1E	1	1	1	1	X	X	X	1	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
				1															
020C1E	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	1	X	X	X
				1															
021C1E	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	1	X	X	X

022C1E	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	1	X	1	X
023C1E	X	1	2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X
024C1E	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
025C1K	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
026C1E	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
027C1E	X	X	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
028C1K	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
029C1K	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	1	X	X	X	1	X	X	X	X	X
030C1E	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
031C1E	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
032C1E	X	X	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
033C1E	X	1	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
034C1E	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
035E1E	2	X	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X	X
035E1K	2	X	X	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	1	X	X	X	X	X

NOT: Tek kare boyalı alan heterozigotu, çift kare boyalı alan homozigotu temsil eder.

Tanımlı Mutasyonlar																				
YENİ MİSSENS MUTASYONLAR				MİSSENS								SNP								
32A-1 c.3642 A>T I1215F				14-1 c.1116C>G F372L								15-1 c.1185T>C D395D								
32E-1 c.4751 G>C S1589T				16-1 c.1418T>G I473S								16-1 c.1463G>C R488P								
32F-1 c.5134 G>T G1712W				16-2 c.1397 G>C G466A								32A-1 c.3785C>T A1262V								
33-1 c.5275 G>C A1780F				32C-1 c.4292G>C C C1431S								32A-2 c.3756G>C L1252L								
34-1 c.5457 T>G V1817G				32E-1 c.4870C>T R1624W								58B-1 c.9237G>A A3079A								
<b>Yeni Çerçeve Kayması</b>				53-1 c.8315 T>C I2772P								58C-1 c.9415 G>T D3139Y								
54-1 c.8442 delT G2781fs				<b>Çerçeve kayması</b>																
58A-1 c.9076delC G3026fs				14-2 c.1068-1069dup P356-fs																
				<b>NONSENSE</b>																
				c.9718C>T R3240X																
				<b>İntronik değişim</b>																
				32A-1 c.3629-32A>G																
				54-1 c.8441-32G>C																

Tüm dizi analizi sonuçları birarada değerlendirildiğinde 33 hastanın ve 2 hastanın anne-babasından çalışılan örneklerde, 10 ekzonda; literatürde kayıtlı 9'u missens, 1'i nonsense ve 1'i çerçeve kayması (frame shift) olmak üzere bilinen 11 mutasyon saptandı. Ayrıca literatürde kayıtlı olmayan 9'u missens ve 2'si çerçeve kayması olmak üzere 11 yeni mutasyon belirlendi. Tek nükleotid polimorfizm (Single Nucleotide Polymorphism-SNP) olarak 15. ve 32. ekzonun 32A bölümünde iki çeşit olmak üzere çalışılanların %70'inde, 58. ekzonun 58B nolu bölümünde bir çeşit olmak üzere bireylerin %30'unda veri elde edildi. Ek olarak 2 intronik bölgede literatürde tanımlı mutasyon belirlendi.



**BÖLÜM 4:**  
**TARTIŞMA**

#### **4. TARTIŞMA**

ORPBH, böbrekte toplayıcı kanallarda kistik genişleme ve karaciğerde duktal plak displazi ile seyreden kalıtsal bir hastalıktır. Etkilenen bireylerin %30-50'si perinatal dönemde, oligohidroamnioz nedeniyle ölmektedir(22,24,25). Belirtilerin ortaya çıkış yaşına, böbrek ve karaciğer hastalığının ciddiyetine göre perinatal, neonatal, infantil ve juvenil olarak dört gruba ayrılır(21). Bu dört grubun tanısı, her grubun kendine özgün bulguları ile değerlendirilir. Çalışmaya katılan hastaların tanıları için güncel olan, Adeva ve arkadaşlarının 2006 yılında sundukları ORPBH'nın tanı kriterleri kullanılmıştır(22).

ORPBH birçok olguda ölüme sebep olduğu için, hasta çocuğu olan aileler prenatal tanıya yönlendirilmelidir. ORPBH'nin fetal ultrason ile prenatal tanısı gebeliğin 21. haftasından sonra mümkün hale gelse de, hafif belirtiler sergileyen olgularda ultrason bulguları prenatal tanı için yetersiz olabilir. ORPBH'nın güvenilir prenatal tanısı yalnızca moleküler genetik analizle mümkündür. Önceden ORPBH'lı çocuk hikayesi olan ailelerde haplotip analizi çoğu durumda uygulanabilecek kolay bir yöntemken, patoanatomik olarak kesin tanısı olmayan ailelerde yanlış teşhise sebep olabilir(45). Hastalığın tam ve kesin tanısında moleküler analizin ciddi düzeyde önemli olduğu kabul edilmiştir. Klinik seyri hafif olan hastalarda genellikle missens mutasyonları, ciddi seyri olan hastalarda ise zincir sonlanma mutasyonu daha sık görülür(52). Mutasyonun bulunduğu yere ve türüne göre hastalığın hafif ya da ağır formda olması nedeniyle, hastalardaki mutasyonların saptanması klinik açıdan çok önemlidir. Çalışmamızda ilgili ekzonlardaki mutasyonların saptanması ile, ebeveynlerin olası gebeliklerde ORPBH'lı çocuk doğurma olma ihtimali göz önünde bulundurularak prenatal tanıya yönlendirilebilecek, böylece de hasta çocuk doğumunun ve bazı durumlarda da ölümünün önlenmesine imkan tanınacaktır. Uluslararası standartlara uygun olarak yürütülen bu çalışma kapsamında mutasyon tarama ve değerlendirme için ciddi düzeyde başlangıç verisi elde edilmiş bulunmaktadır. Bu sonuçların, klinisyenlerle birlikte değerlendirilmesiyle genotip fenotip, olası sağaltım uygulamaları için kaynak tablolar geliştirilebilecek ve buna paralel olarak aileler bilgilendirilerek prenatal tanıya yönlendirilebileceklerdir. Bitirilen çalışmada çocukları ölmüş anne babadan alınan örneklerin

her ikisinde de aynı çerçeve kayması mutasyonu saptanmış olup, yeni gebeliklerinde en az %25 olasılıkla hasta çocuğu olabilir.

PKHD1 geni için 2007 yılı sonunda yurt dışındaki farklı merkezlerde saptanan 284 mutasyonu kapsayan veri tabanı yayınlanmıştır (<http://www.humgen.rwth-aachen.de>). Bu veri tabanında yer alan araştırmalarda 45 Türk hastada, 22 değişik ekzonda, 35 farklı mutasyon bulunduğu görülmüştür. Bu mutasyonların %66 .6'sının 10 farklı ekzonda (14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60) yer aldığı belirlenmiştir (39). Bu araştırmada, yürütüleceği zaman, maliyet ve yarar dikkate alındığında, öncelikli olarak PKHD1 geninin yukarıda belirtilen 10 ekzonunda DNA dizi analizi ile mutasyon saptanması hedeflendi.

Litaretürdeki DNA dizi analizi ile PKHD1 geninde mutasyonlarını inceleyen çalışmalar, PCR için gerekli primer dizileri açısından değerlendirildi. Losekoot ve arkadaşlarının 2005(42) ve Rosetti ve arkadaşlarının 2003(51)'de kullandıkları primerlerin diğer araştırmacılar tarafından da kullanıldığı görüldü. Seçtiğimiz 10 bölgeye yönelik primerlerin PKHD1 geninin NCBI veri tabanında yer alan dizisine hibridize olup olmadığı kontrol edildi. Primerlerin diziyile birebir eşleşmeleri ve DNA dizi analizinde kaliteli sonuçların elde edilmesi için ileri ve geri primerlerin ekzonun başlama ve bitişinden 20-30 nükleotid uzaklıkta olması ve de çoğaltılan bölgenin de 200-400 bç arasında olmasına özen gösterildi. Bu kriterler dahilinde Rosetti ve arkadaşlarının 2003 (51)'de kullanmış oldukları primerlerin kullanılmasına karar verildi. 32 ve 58 nolu ekzonların sırasıyla 1608 bç ve 879 bç uzunlukta olması nedeniyle 32 nolu ekzon 7, 58 nolu ekzon ise 4 ayrı ileri ve geri primer kullanılarak çoğaltıldı.

Mutasyon taranması, Restriksiyon enzimi kesimi yöntemi, Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP), Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC) ve DNA dizi analizi gibi birçok yöntemle yapılabilmektedir. Restriksiyon enzimi kesimi yöntemi, bilinen bir bölgedeki ve tanımlanmış mutasyonların saptanması amacıyla kullanılır. Dolayısıyla yeni mutasyonlar ve SNP'ler bu yöntemle saptanamayabilir.

SSCP ve DHPLC yöntemi ile DNA dizisinde yapısal değişiklikler olup olmadığı belirlenebilir ancak değişimlerin tam yerinin saptanması için ek olarak DNA dizi analizine ihtiyaç olmaktadır. Maliyet olarak değerlendirildiğinde SSCP ilk bakışta daha ucuz bir yöntem olarak gözükse dahi, SNP ve mutasyon sıklıklarının fazla olması sebebiyle ve DNA dizi analizinin ticari olarak yaygın ve uygun fiyatlarla sunulması sayesinde avantajlı hale gelmektedir. Ayrıca DNA dizi analizi otomatize sistemlerle yapılabildiğinden, diğer yöntemlere göre uygulaması çok daha kolay olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı seçtiğimiz 10 ekzonda mutasyon taranmasının DNA dizi analizi ile yapılmasına karar verildi.

Tüm dizi analizi sonuçları birarada değerlendirildiğinde 33 hastanın ve 2 hastanın anne-babasından çalışılan örneklerde, 10 ekzonda; literatürde kayıtlı 9'u missens, 1'i nonsense ve 1'i çerçeve kayması (frame shift) olmak üzere bilinen 11 mutasyon saptandı. Ayrıca literatürde kayıtlı olmayan 7'si missens ve 2'si çerçeve kayması olmak üzere 9 yeni mutasyon belirlendi. Tek nükleotid polimorfizm (Single Nucleotide Polymorphism-SNP) olarak 15. ve 32. ekzonun 32A bölümünde iki çeşit olmak üzere çalışılanların %70'inde, 58. ekzonun 58B nolu bölümünde bir çeşit olmak üzere bireylerin %30'unda veri elde edildi. Ek olarak 2 intronik bölgede literatürde tanımlı mutasyon belirlendi.

Hastaların 2'sinde, 32. ekzonda literatürde tanımlı c.4870C>T R1624W missens mutasyonu heterozigot olarak gözlenmiştir. R1624W mutasyonu, Onuchic ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları çalışmada 1 Suudi ailede, Losekoot ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada 1 Alman ailede ve 2005 yılında Sharp ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 3 Suudi ailede görülmüş ve muhtemel patojenik, nadir görülen bir mutasyon olarak tanımlanmıştır (42). Tablo 3. 3. 1'de gösterilen; dört hasta ve bir annede 32. ekzondaki 3 mutasyon (c.3642 A>T I1215F, c.4751 G>C S1589T, c.5134 G>T G1712W) ile 3 hastada sırasıyla 33. ekzonda c.5275 G>C A1780F, 34. ekzonda c.5457 T>G V1817G ve 54. ekzonda heterozigot c.8442 delT mutasyonları ise önceden literatürde tanımlı olmaması açısından önemlidir.

İncelenen 10 ekzonda, 35 toplam 20 mutasyon saptandı (%57). Literatürde ORPBH hastaları arasında PKHD1 geninde mutasyon saptama yüzdesinin ortalama olarak %42-%80 civarı olduğu düşünüldüğünde, saptanabilen mutasyonların %71'den fazlasının sözü geçen 10

ekzonda bulunduğu söylenbilir (18). Bu oran, literatürde toplam 45 Türk hasta üzerinde yapılan diğer çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik gösterse dahi, mevcut bütün çalışmalarda hasta sayısı düşüktür. Mutasyon eşitlerinin dağılımmının daha doğru bir şekilde belirlenmesi ancak geniş hasta gruplarının taranması ile mümkün olacaktır. Ayrıca 24 bireyde çalışılan 10 ekzonunun hiçbirinde mutasyon gözlenmemesi PKHD1 geninin toplamda kodlanan 67 ekzonunun olmasından kaynaklanabilir. Bu hastaların geri kalan ekzonları ileriye yönelik bir çalışmada çalışılmalıdır. Diğer taraftan intronik mutasyonların veya oklu SNP'lerin varlığı da bu durumun bir kısmını açıklayabilir. Öyle ki DNA dizi analizi ile doğrudan tüm ekzonları incelenen hastaların dahi en fazla %95'inde mutasyon saptayabilmek mümkün olabilmektedir (40).

Yapmış olduğumuz alışma, Türkiye'de daha önce DNA dizi analizi ile PKHD1 geninde mutasyon analizi yapılmamış olması açısından önem taşımaktadır. Taramanın DNA dizi analizi ile yapılmış olması ile, řu ana kadar tanımlı mutasyonların dışında yeni değişimler saptanarak literatüre katkıda bulunmuştur. Elde edilen veriler klinisyenlerle paylaşılmıştır.

## **BÖLÜM 5**

### **EKLER**

**Ek 1:** PKHD1 Geninin 14, 15, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 60 nolu ekzonlarının NCBI'da ki NC\_000006.10 nolu dizisi

**Ek 2:** DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulun tez projesi hakkındaki kararı.

**Ek 3:** Etik kurulun onayladığı Gönüllü Bilgilendirme Formu )

14. Ekzon

ACTTGATTCTCTTTTCTAGGAACTCTTGCTAAAAAAGGCTAACTCCTAACCCATGGAATGTTTATTAC  
TTTCCGGAACATTTGTATTTTCATATTA ACTACAGAACCTTTCATATAACTACTCTATCTGGCTCTAGG  
TTGACTTACCTTTACAGGTAGCATCTGGGTCATCTTTCACCTTGTAATTTAAAATAAAGTAATTCCCC  
AATTTGGGAAGGTGCGCCCTGTAATGTTTATGCGATCTACATGTCTTACAGGCAATCGAGGGCTTCTT  
TTTGAAGTTGGAGATGCTGTTGAGGGACTGGAACTGACTGAAGCCACCCCAGGGTACAGGTGGCAGAT  
TGTCCTTAATGCCAGTTCTCCATTTGGGTTTTGGTCACAGGAAGGACAACCTTTCAGGTATGTTGTAG  
GAAAAGTGGGAGCCCACATCAAAGCACCTTTGCTAACCTAGGTGAGGCTAGGAGACAGATAAGGAAG  
GTATCAAGATTTCCAGGAATTTATAACACTAGCCAATTCAACAACAACAGAGTTTGACAGTATTCTCA  
ATCAGTGTGGTCATGCTAGTGCAGGGACAAATTTTGATCAATATGTAATATGTATATTTTCCACAAC  
TTAGTTTACAATCTGTTT

15. Ekzon

GGTATTTGTGTCCAGTGTAGAGATGTATTGGGCTACTGAGACTAGGCAGGTGCTATATCTCTTTCTAG  
AATATTCTGGACAATTGTGTGGCATAAGAATCAGGTTGTTCTTCTTTATTACCATAAAAGAAGACAAA  
GTACAAGGGCAGTCATTTGTTGGTTCAGTGATTCAGGCCTTGTTACTCTTGCTTGACTCTATGTTCT  
ACTTTACAGAGCACGGCTCAGTGGGTTCTTTGTGGCTCCAGAGACAAATAATTACACTTTTCTGGATTC  
AGGCAGATAGCCAAGCTTCCTTGCATTTCAGTTGGTCAGAGGAACCAAGGACTAAGGTATTCACTGTC  
TTCTCATTTTCTTTTCTCTGTTGCCAGTCCCATACCCATGAAGAAAGAAAGAATCAAAGTTAAGGCT  
CTCATGTTTTACAGATAGTTTAAACATGCCATTGGATGATCAGGAACCTTTAATTGTTGAAAAGAAGCT  
GTTTGAATGTGAACGTACTATTTATTGAGCATTACTGTAAGCCAAATATTATGCTACATCTTTTATA  
GACCTTGTCTCTAGTT

16. Ekzon

GATAGATAGATAGAGAGCTGGAGAAGCATAAAATAACCACAGGGCTGAGGTA ACTGGGTTAATATGTTA  
AAAAGGCAGACCAGTTCAA AACTCTCTTGATAGTAGCAGTTCAGACACTTAGTGTTTGAGAAAGAGAT  
GCCTGGAAGCTGCATAGTATTGATCATGATATGCTTATTTGGGCATAGGTGAAAGTGGCCTCCATCAG  
CGTCGGCACTGCTGACTGGTTTTGACTCCTGGGAGCAGAATAGGGATGAAGGGACCTGGCAGCAGAAGA  
CTCCCAAGTTGGAGCTGTTGGGTGGAGCCATGTACTACCTGGAAGCAGAGCATCATGGGATAGCCCCA  
AGCAGGGGGATGAGGATTGGTGTCCAGATTCACAACACCTGGCTGAATCCTGATGTGGTCACCACTTA  
CCTACGGGAGAAGCACCAGATCCGAGTCCAGCCCAGAGGCTTCCAGAAGTACAGGTCTGTGTCTCTT

TCCAGTCCCATGGAGCTGAACTCTGGAAGGAATAAAGTCCCATGTAGCAGGAGCACTGACTGGGAGTC  
TGGCGACCTGAGGGGTCAATTATAACCTTGCTGTCAAAGAAATAGGATATCTCTTTAACAGCATTGTGA  
AGATGTTTACAAAAATGT

32. Ekzon

TGTGAATTTACCACATCTGACTCCTGTCTAAATAATCACAAATTTAGCTTTGGTGGGGGTGAGAAAA  
ATAATTGAGGTTTCACTAACACATGCCCTACCTTCCACTTAATTGACCTAGGACTTCCACAGGTGCTA  
TGAATTCTTAGTTTCAAGATATCAGCTATAATATTTTGCTTCCGTATTCATACTTTAGGAGGGACCAT  
CCTCAGCATCTCAGGAATAGGCTTCAGCAGGGACCCAGCTTTGGTTTGGGTACTTGTGGGCAATCGGT  
CCTGTGACATTGTGAAACTTAACGGAGGCGAGCATCTGGTGTGAAACCCTGCCAGCCCCCCAGATACCC  
GATGCGGGCGCTCCCCTGTTCCAGCTGCCGTGGAGGTCTGGGCTGGCAACAGGTTCTTCGCCCGTGG  
TCCTTCACCAAGCTTGGTGGGGAAAGGCTTACCTTCATGTATGAAGCGGCAGCAACACCAGTAGTCA  
CTGCCATGCAAGGAGAAATACAAATAGCAGCCTGAGCCTGCATGTGGGAGGAAGTAACCTCTCCA  
CAGTCATCCTTCTGGGGAACCTGAACTGTGATGTTGAGACACAGTCCTTCCAGGGCAACGTGAGCCTG  
TCTGGATGCTCCATCCCTCTTCACAGTCTGGAGGCTGGCATCTATCCTCTCCAAGTACGTGAGAAGCA  
GATGGGATTTGCTAATATGTCTGTGGTGTCTCCAGCAATTTGCAGTGATGCCTCGGATAATGGCCATCT  
TCCCATCGCAGGGTTCCGGCATGTGGTGGGACCATACTTACTGTGAGGGGGTTGCTTCTAACTCTAGA  
AGGAGGTCAGTTCGGGTTGACCTCTCGGGTCCTTTTACTTGTGTGATTTTGAGTTTGGGAGACCACAC  
CATTCTCTGCCAGGTTAGCCTGGAGGGTGACCCCTTGCTGGAGCTTCTTCTCCCTGAACGTCACAG  
TCCTGGTCAATGGGCTAACCAGCGAGTGTCAGGGGAATTGCACTCTTTTCATAAGGGAAGAGGCAAGT  
CCTGTCATGGATGCCTTGTCCACAAACACCAGTGGGTCTCTGACCCTGTGCTGATTAGGGGCAGAG  
GTTAGCCACCACAGCTGATGAGCCGATGGTATTTGTGGATGATCAACTTCTTGCAATGTAACCTTTTT  
TTAATGCAAGCCACGTTGTGTGCCAGACAAGAGACTTGGCCCCAGGACCCCACTACCTGTCAGTTTTT  
TATACAAGAAATGGGTATGCTTGTCTGGTAATGTTTCCAGACACTTCTACATTATGCCCCAAGTGT  
TCATTATTTTCCTAAGAATTTCAGCTTACATGGTGGAAAGCCTCTTGACCATAGAGGGCACAGGCCTGA  
GAGGACAGAACACCACGTCAGTCTATATTGACCAGCAGACCTGCCTGACGGTGAACATCGGTGCTGAG  
CTCATCCGGTGCATTGTTCCACAGGGAATGGCTCTGTTGCCCTGGAAATAGAGGTAGATGGACCTTTG  
GTATCACATAGGAGTCATTGGTTATAACAAGGCCTTTACCCAGAAATTGATCTCTATTTCTCAGAGCG  
ATGACATCTTAACCTTTGCAGTGGCCAGATTCTCAGGAGCTGCAAACATTGACATTTTTATAGGAATG  
TCACCCTGTGTGGGTGTCTCTGGTAACCACACCGTTCTTCAGTGCCTGGTCCCTTCCCTTCCGGCCGG  
GGAGTACCACGTCAGAGGCTATGACTGCATCAGAGGGTGGGCCTCATCTGCCCTGGTGTTACCTCAA  
GAGTTATTATTACAGCAGTGACGGAGAACTTCGGTAAGTCAAGCAAATAAGACAGCCACACTTTCTTTA  
TGTAAATGAATTGGTAGCTCCTTTCACCTCTGAAAGTAGAAAATTAACAACAATCTGCCTGATGGAAG



GAAAGAGAAGCCCACTGGCTTCTTACAATCCCAATTCCTTCCTGAGGCTTGTCTTTGTTATGCTCTGT  
TTATGAAGATTTTTTTTTATTTTTATCAAGGAACTGTGCATATTCTCTAAATGTTTG

33. Ekzon

AAAAGAAGAATGGGTAGTGAGGAAGCAAATGTTTGAATTTTGAGTTGAGTAAAGAAGGGAGATTGCC  
TGTATGATCAAGAACTTGTACCTTTGTCTTTAAAGGCTGCCTGGGTGGAAGGCTGGTGCATGTGTTTG  
GAGCGGGATTTTCTCCAGGGAATGTCTCAGCTGCTGTGTGTGGTGTCTCCCTGCCGAGTCCTGGCTAAT  
GCTACAGTGTCTGCCTTCAGCTGCTTGGTTCTGCCCTGGATGGTGAGTAAAGATGCCACACACATAT  
ATTTTAAAGCATATATATGGAAATGATATTCTTTGGTTAATTCTATTTTTGTGATTAATG

34. Ekzon

ACATTTTAAAAAAGTAACTGCTAACTTCATATTCCTATTGGTCAAAGGAGGACACAGGAACTTCAT  
TTGTGAAACCGACTAGAGGCCTTAGGTTCTCTCTGTGGTTCTTTCCTAATGGTGACTGTTTCCTGCAG  
TGTCCTTGGCCTTCCTGTGTGGCCTGAAGCGTGAGGAGGACAGCTGTGAGGCTGCCAGACACACCTAT  
GTGCAGTGTGATTTGACAGTTGCCATGGCGACAGAGCAACTGCTTGAATCGTGGCCTTACCTCTACAT  
TTGCGAGGAAAGTTCCCAATGCCTCTTTGTGCCAGATCATTTGGGCAGAGTCAATGTTTCCATCATTCT  
CGGGCCTCTTTATCAGGTAACCTTACCTTCTCCCTCCCTGAACTTCCCCACAAATGCTTGGCCAATGG  
ACCGATGGAGCCATCAGAGAGTGTAGGCTGGGTGG

53. Ekzon

CTGTTTTAGATAAACTGTACACAGCTCCCAAACCTGCTGGGAGAACCCAGAATAAACACGTAATTCT  
TGTTTTTGTGACATATCTGAGCAATTTCTTTTTCTTCCACAGACAGAACTGTCCTTGTGGATACAGAT  
CTTCCATTCTTCAAAGGGCTGTATGTGATGGGACCTTAGACTTCCCTGTGGACAGAAGCAATGTTCT  
GAGTGTGGCATGCATGGTCATTGCAGGCGGGGAGCTGAAAGTTGGTGAGTAAAGGCACAAGGATTGCG  
AGCATGTTGAGAATTATATTCTGTGAGAAGGGCTCTGGGAAACAGATGGTATCATCAAGCAGGTTGC  
TTAACAGAGTTTAGGGAGGGTTAAGGTAGTAGTGAGTGCACCAG

54. Ekzon

ACATTGCATTATTGAAATTATACTGCAATTTCTCCCTCTCTTTCTTTTAATTTCAAATTGATTGAAAT  
GATATACTTTTCTTTGTAAACAGGTACTTTAGAAAATCCCTTAGAAAAGGAACAAAAGCTTCTGATTC  
TCCTTAGAGCCTCAGAGGGAGTCTTTTGTGACCGTATGAATGGAATTCATATTGACCCAGGAACAAT  
GGTAAGAGTATAATATAGTTTTTATTAATAATAAATGCATGTGTGTGATTGTGTGCTTGTGTCTGA  
TAGAGAAATACTATTCATAGAACATATGCTAAATCCAAACACCCTTTTAGGCAATTTATAT

58. Ekzon

AATGTTTCATATCTTAATGCCCCAAAATGGGCCATTCTTCAGCCTTTTGTGGGAAGAGGAAAGTACCT  
GATGACATGCATTTGTTTATAGGTGTCCTTCAACTTCTTAATGTGGAAATTCAGAACTTCGGGTCACC  
ATTGTACTCATCTGTTGAATTCAGTAATGTGTCAGCAGGATCCTGGATCATATCATCTACTCTGCACC  
AGAGCTGTGGCGGGGCATTTCATGCAGCTGCCAGTCATGGAGTACTTTTAAATGACAATATTGTGTTT  
GGCACAGCTGGCCATGGCATAGATTTAGAGGGTCAGGCCTATACTGTCACTAATAACCITGTGGTTCT  
GATGACACAGCCAGCGTGGTCCACCATTTGGGTGGCGGAATCAAAGTGAACCAGGTAAGGACATCA  
ACCTCCATGGCAACGTTGTGGCAGGATCAGAGAGACTTGGCTTTCACATCCGAGGCCACAAGTGCTCC  
TCTTGTGAAGCTGCTTTGGTCTGACAATGTGGCGCATTCAAGTCTTCATGGCCTTCATCTCTATAAGGA  
AAGTGGACTTGACAACTGTACCAGAACTCTCTGGCTTCTTGGCTTTCAGAAGCTTTGACTATGGTGCCA  
TGTTACATGTAGAGAACAGCGTGGAGATAGAGAACATTACTCTGGTAGACAATACTATTGGTCTTTTG  
GCAGTAGTGTATGTATTTTCTGCTCCACAATAATCCGTCAAAAAGTGCAGATTGTGCTTAGGAATTC  
AGTCATTGTGGCCACCAGCTCTTCTTTTACTGTCATTTCAGGACAAAGTGAAGCCGCACTCAGCCAACT  
TGACATCAACAGATAGAGCTCCCTCCAAATCCAAGAGGAGGTCGAATTGGTATTCTGTGGCCTGTATTC  
ACCTCAGAACCAAATCAGTGGCCTCAGGAGCCATGGCACAAAGTGAAGGAATGATCATTCAATTCAGG  
AATCATGAAACTTCAAGGTAGGATGTTTTATTTTATCTAGGCAGTGCCATTTACATACATCCATGCATA  
AAATTTTTAATGGCATTCTGAAATTTTATC

60. Ekzon

AACAACATTAGCACTACCAATGTATATTTTCTTCTTGCTGCTTATCATGAAATGAAAGAGTTGCTTTT  
TGACTGTCTTCACAGGAAAGATTTAGGAAAAGTAGTCTGTCCCTGAATTAGACTGTGCAAGTCCAAGAA  
AATATCTCTTCAAGGATCTGGATGGGAGAGCCCTGGGTCTGCCTCCACCAGTTTCTGTATTTCTTAA  
ACAGAGGCAGAATGGACTGCATCCTTCTTCAACGCAGGTAAGCTATACTGAATGCAATGCCTGTGGT  
AGAGGCAAGGGTCTTGTGAAGGAGCTGGTTTTGCTGTGCTCACTGAGAATGAAATGTACTGGTGAAG  
ACCTAAATTC

## GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Otozomal resesif polikistik böbrek hastalığı (ORPBH), genellikle çocukluk çağında meydana gelen, karaciğer ve böbreklerde tahribata ve hatta ölüme neden olabilen kalıtsal olarak geçen tek gen hastalığıdır. Otozomal resesif böbrek hastalarında ve aile üyelerinde hastalıkla ilgili genetik değişikliklerin saptanması ile olası gebeliklerde doğacak olan çocuklarının Otozomal Resesif Böbrek Hastası olma ihtimali göz önünde bulundurularak prenatal tanıya yönlendirilmeleri amaçlanmaktadır.

Bu araştırma Yüksek Lisans tez çalışması olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Orhan Terzioğlu danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Özgür Bülbül tarafından yürütülecektir. Bu çalışmada Otozomal resesif polikistik böbrek hastalığına neden olan ilgilenilen altı gen bölgesindeki kalıtsal değişikliklerin saptanması, uluslararası standartlara uygun olarak yapılacaktır. Çalışmaya gönüllü olarak katılmak isteyen hastalardan hiçbir ücret talep edilmeyecektir.

'Otozomal Resesif Polikistik Böbrek Hastalarında PKHD1 geninin 14, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 59 ve 60 nolu ekzonlarındaki mutasyonların DNA dizi analizi ile saptanması' isimli çalışma için sizden alınacak kan örneği sadece bu hastalıkla ilgili mutasyonların taranması amacıyla kullanılacaktır. Başka amaçlarla kullanılmayacaktır.

Bu çalışmaya katılmak isterseniz, sizden 5 ml kan alınacaktır. Bu kanlardan DNA (kalıtım materyali) elde edilecek, Otozomal resesif polikistik böbrek hastalığı ile ilgili çalışmamızda ilgilenilen altı gen bölgesindeki değişiklikler taranacaktır. Elde edilen sonuç doktorunuza iletilecektir ve bu konuda size bilgi verilecektir. Gerek gördüğünüzde araştırmacılara ulaşabilirsiniz.

Çalışmaya katılma tamamen isteğe bağlıdır. Kararınız ne olursa olsun bu tedavinizi ve sağlık personeliyle olan ilişkinizi olumsuz etkilemeyecektir.

Yukarıdaki 'Otozomal Resesif Polikistik Böbrek Hastalarında PKHD1 geninin 14, 16, 32, 33, 34, 53, 54, 58, 59 ve 60 nolu ekzonlarındaki mutasyonların DNA dizi analizi ile saptanması' isimli genetik çalışma için gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya 5ml kan vererek, kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün ;

Adı:

İmzası:

Adresi:

Varsa telefon no, faks no:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasiinin;

Adı:

İmzası:

Adresi:

Varsa telefon no, faks no:

Açıklamaları yapan kişinin;

Adı:

İmzası:

Görevi:

**BÖLÜM 6**  
**KAYNAKLAR**

## **6. KAYNAKLAR**

1. Igarashi P, Somlo S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 2002; 13:2384-98.
2. Wilson P. Polycystic kidney disease: new understanding in the pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004; 36:1868-73.
3. Hateboer N, vDijk MA, Bogdanova N, Coto E, *et al.* Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 study group. *Lancet*, 1999; 353(9147):103-7.
4. Torres VE, Harris PC. Mechanisms of disease: autosomal dominant and recessive polycystic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2006; 2(1):40-55.
5. Chapman AB. Autosomal dominant polycystic kidney disease: time for a change? *J Am Soc Nephrol*, 2007; 18:1399-1407.
6. McCluskey M, Schiavello T, Hunter M, Hantke J, *et al.* Mutation detection in the duplicated region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene in PKD1-linked Australian families. *Hum Mut*, 2002; 19:240-50.
7. Qian Q, Hartman RP, King BF, *et al.* Increased occurrence of pericardial effusion in patients with autosomal dominant kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2, 2007; 1223-1227.
8. Grantham JJ, Chapman AB, Torres VE. Volume progression in autosomal dominant polycystic kidney disease: the major factor determining clinical outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006; 1:148-57.
9. Pei Y, Paterson AD, Wang KR, He N, *et al.* Bilineal disease and trans-heterozygotes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Hum Genet*, 2001; 68:355-63.
10. Bergmann C, Frank V, Küpper F, Kamitz D, *et al.* Diagnosis, pathogenesis, and treatment prospects in cystic kidney disease. *Mol Diag Therapy*, 2006; 10(3):163-74.
11. Pei Y. Diagnostic approach in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006; 1:1108-14.

12. Avner ED, Sweeney WE. Renal cystic disease: new insights for the clinician. *Pediatr Clin N Am*, 2006; 53:889-909.
13. Rosetti S, Haris PC. Genotype-Phenotype Correlations in Autosomal Dominant and Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 18, 2007; 1374-1380.
14. Yoder BD, Hou X, Guay-Woodford LM. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol*, 2002; 13:2508-16.
15. Hayashi T, Mochizuki T, Reynolds DM, Wu G, *et al.* Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2). *Genomics*, 1997; 44:131-36.
16. Harris PC, Torres VE. Understanding pathogenic mechanisms in polycystic kidney disease provides clues for therapy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006;15:456-63.
17. Zerres K, Mücher G, Becker J, Steinkamm C, *et al.* Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): molecular genetics, clinical experience, and fetal morphology. *Am J Med Genet*, 1998; 76:137-44.
18. Bergmann C, Senderek J, Küpper F, Schneider F, *et al.* PKHD1 mutations in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hum Mut*, 2004;23:453-63.
19. Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Steinkamm C, Becker J, *et al.* Autosomal recessive kidney disease. *J Mol Med*, 1998; 76:303-309.
20. Menezes LF, Onuchic LF. Molecular and cellular pathogenesis of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Brazil J Med Biol Res*, 2006; 39:1537-48.
21. Sweeney WE, Avner ED. Molecular and cellular pathophysiology of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Cell Tissue Res*, 2006; 326:671-85.
22. Adeva M, El-Youssef M, Rossetti S, Patrick SK, *et al.* Clinical and molecular characterization defines a broadened spectrum of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Medicine*, 2006; 85:1-12.
23. Bergmann C, Frank V, Küpper F, Schmidt C, *et al.* Functional analysis of PKHD1 splicing in autosomal recessive polycystic kidney disease. *J Hum Genet*, 2006; 51:788-93.

24. Guay-Woodford LM, Desmond RA. Autosomal recessive polycystic kidney disease: the clinical experience in North America. *Pediatrics*, 2003; 111:1072-80.
25. Tahvanainen E, Tahvanainen P, Kaariainen H, Höckerstedt K. Polycystic liver and kidney diseases. *Annals Med*, 2005; 37:546-55.
26. Harris PC, Rossetti S. Molecular genetics of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Mol Genet Metabol*, 2004; 81:75-85.
27. Banales JM, Masyuk TV, Bogert PS, Huang BQ, *et al.* Hepatic cystogenesis is associated with abnormal expression and location of ion transporters and water channels in an animal model of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Am J Pathol*, 2008; 173(6):1637-46.
28. Turkbey B, Ocak I, Daryanani K, Font-Montgomery E, *et al.* Autosomal recessive polycystic kidney disease and congenital hepatic fibrosis (ARPKD/CHF). *Pediatr Radiol*, 2009; 39:100-11.
29. Zerres K, Mucher G, Bachner L, Deschenes G, *et al.* Mapping of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) to chromosome 6p21-cen. *Nat Genet*, 1994; 7(3):341-2.
30. Huges J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, *et al.* The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet*, 1995; 10(2):151-60.
31. Onuchic LF, Furu L, Nagasawa Y, Hou X, *et al.* PKHD1, The polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats. *Am J Hum Genet*, 2002; 70:1305-17.
32. Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S, Walker D, *et al.* The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet*, 2002; 30:259-69.



33. Wang S, Zhang J, Nauli SM, Li X, *et al.* Fibrocystin/polyductin, found in the same protein complex with polycystin-2, regulates calcium responses in kidney epithelia. *Mol Cell Biol*, 2007; 27(8):3241-52.
34. Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, *et al.* Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet*, 2003; 12(20):2703-10.
35. Zhang MZ, Mai W, Li C, Cho SY, *et al.* PKHD1 protein encoded by the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease associates with basal bodies and primary cilia in renal epithelial cells. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2004; 101(8):2311-16.
36. Wang S, Luo Y, Wilson PD, Witman GB, *et al.* The autosomal recessive polycystic kidney disease protein is localized to primary cilia, with concentration in the basal body area. *J Am Soc Nephrol*, 2004; 15:592-602.
37. Heisberger T, Gourley E, Erickson A, Koulen P, *et al.* Proteolytic cleavage and nuclear translocation of fibrocystin is regulated by intracellular Ca<sup>2+</sup> and activation of protein kinase C. *J Biol Chem*, 2006; 281(45):34357-64.
38. Wu Y, Dai XQ, Li Q, Chen CX, *et al.* Kinesin-2 mediates physical and functional interactions between polycystin-2 and fibrocystin. *Hum Mol Genet*, 2006; 15(2):3280-92.
39. Department of Human Genetics, Aachen University. Mutation database:autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD/PKHD1)[online].Available from URL:<http://www.humgen.rwth-aachen.de>[Last modified: 2008/12/05]
40. Bergmann C, Küpper F, Dornia C, Schneider F, *et al.* Algorithm for efficient PKHD1 mutation screening in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hum Mut*, 2005; 25:225-31.
41. Bergmann C, Senderek J, Windelen E, Küpper F, *et al.* Clinical consequences of PKHD1 mutations in 164 patients with autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Kidney Int*, 2005; 67:829-48.

42. Losekoot M, Haarloo C, Ruivenkamp C, White SJ, *et al.* Analysis of missense variants in the PKHD1-gene in patients with autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hum Genet*, 2005; 118:185-206.
43. Sharp AM, Messiaen LM, Page G, Antignac C, *et al.* Comprehensive genomic analysis of PKHD1 mutations in ARPKD cohorts. *J Med Genet*, 2005; 42:336-49.
44. Furu L, Onuchic LF, Gharavi A, Hou X, *et al.* Milder presentation of recessive polycystic kidney disease requires presence of amino acid substitution mutations. *J Am Soc Nephrol*, 2003; 14:2004-14.
45. Zerres K, Senderek J, Rudnik-Schöneborn S, Eggermann T, *et al.* New options for prenatal diagnosis in autosomal recessive polycystic kidney disease by mutation analysis of the PKHD1 gene. *Clin Genet*, 2004; 66:53-57.
46. Garcia-Gonzales MA, Menezes LF, Piontek KB. *et al.* Genetic interaction studies link autosomal dominant and recessive polycystic kidney disease in a common pathway. *Hum Mol Genet*, 2007; Vol.16, No.16: 1940-1950.
47. Torres VE, Harris PC. Polycystic kidney disease: genes, proteins, animal models, disease mechanisms and therapeutic opportunities. *J Int Med*, 2007; 261:17-31.
48. Goilav B, Satlin LM, Wilson PD. Pathways of apoptosis in human autosomal recessive and autosomal dominant polycystic kidney diseases. *Pediatr Nephrol*, 2008; 23:1473-82.
49. Maniatis T, Sambrook J. Fritsch Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd edition Vol.3. Cold Spring Harbor lab. Press New York. 1989
50. Çam S. Hipertrofik Kardiyomiyopatiye yol açan beta-miyozin ağır zinciri gen bölgesinde Arg403Gln, ARG453Cys, Arg719Trp ve Arg719Gln mutasyonlarının aile düzeyinde saptanması. Doktora Tezi, İzmir. DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2000.
51. Rossetti S, Torra R, Coto E, Consugar M, *et al.* A complete mutation screen of PKHD1 in autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD) pedigrees. *Kidney Int*, 2003; 64:391-403.

52. Zhang Q, Taulman PD, Yoder BK. Cystic kidney diseases: all roads lead to the cilium. *Physiology*, 2004; 19:225-30.