TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

AİLEVİ VE SPORADİK STEROİDE DİRENÇLİ NEFROTİK SENDROM OLGULARINDA PODOSİN GEN DEĞİŞİMLERİ

Doç. Dr. Zeynep Birsin ÖZÇAKAR

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEFROLOJİ BİLİM DALI
TIPTA YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Fatoş YALÇINKAYA

ANKARA

2010

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

AİLEVİ VE SPORADİK STEROİDE DİRENÇLİ NEFROTİK SENDROM OLGULARINDA PODOSİN GEN DEĞİŞİMLERİ

Doç. Dr. Zeynep Birsin ÖZÇAKAR

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEFROLOJİ BİLİM DALI
TIPTA YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Fatoş YALÇINKAYA

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 20040809190 Proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA

2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	**i**
İçindekiler	**ii**
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	**iii**
Şekiller Dizini	**iv**
Tablolar Dizini	**iv**
1. GİRİŞ VE AMAÇ	**1**
2. GENEL BİLGİLER	**3**
2.1. Nefrotik sendrom tanımı ve nedenleri	**3**
2.2. Epidemiyoloji ve sınıflandırma	**3**
2.3. Klinik ve laboratuar bulguları	**6**
2.4. Patogenez	**7**
2.5. Podosit hasarı	**8**
2.6. Kalıtsal nefrotik sendromlar	**11**
2.6.1. Fin tipi konjenital nefrotik sendrom	**11**
2.6.2. Otozomal resesif steroide dirençli nefrotik sendrom	**12**
2.6.3. Otozomal dominant fokal segmental glomerüloskleroz	**13**
2.6.4. Sendromik hastalıklar	**14**
3. GEREÇ VE YÖNTEM	**17**
4. SONUÇLAR	**24**
5. BULGULARIN ÖZETİ	**34**
6. TARTIŞMA	**35**
7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	**42**
ÖZET	**43**
SUMMARY	**44**
KAYNAKLAR	**45**
EKLER	
Ek 1.	**52**

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFP: α – fetoprotein

DDS: Denys-Drash Sendromu

FSGS: Fokal segmental glomeruloskleroz

GBM: Glomerül bazal membranı

HT: Hipertansiyon

MDNS: Minimal değişiklik nefrotik sendrom

MezPGN: Mezangial proliferatif glomerulonefrit

MMF: Mikofenolat mofetil

MN: Membranöz nefropati

MPGN: Membranoproliferatif glomerulonefrit

NS: Nefrotik sendrom

ÖOP: Özgül olmayan patoloji

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

SSCP: Tek zincir uygunluk polimorfizmi

SDBY: Son dönem böbrek yetmezliği

TRPC6: Transient receptor potential cation channel 6

WT1: Wilms tümörü baskılayıcı geni

ŞEKİLLER VE TABLOLAR

Sayfa No

Şekil 2.1. Glomerül filtrasyon bariyerinin şematik görüntüsü……9

Şekil 2.2. Podosit ayaksı çıkıntılarının moleküler yapısı…….. 11

Şekil 4.1. Saptanan gen değişimleri……. 32

Tablo 2.1. Nefrotik sendrom nedenleri……..4

Tablo 2.2. Nedeni bilinmeyen nefrotik sendromda histopatalojik sınıflandırma……...5

Tablo 2.3. Nefrotik sendroma neden olan genetik podosit bozuklukları……..15

Tablo 3.1. *NPHS2* geni mutasyon analizinde kullanılan primerler……...20

Tablo 4.1. Çalışma grubunu oluşturan hastaların özellikleri……..27

Tablo 4.2. *NPHS2* gen değişimi saptanan hastalar…… ...33

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nefrotik sendrom (NS) glomerül kapiller duvarının seçici geçirgen özelliğindeki değişiklikler sonucu oluşan; ağır proteinüri, hipoalbuminemi, ödem ve hiperlipidemi bulguları ile seyreden kronik bir böbrek hastalığıdır (1).

Çocukluk çağındaki NS'ların %95'ini nedeni bilinmeyen NS oluşturmaktadır (2) ve büyük çoğunluğu başlangıçta uygulanan 4-8 haftalık steroid tedavisine yanıt vermektedir. Başlangıç steroid tedavisi ile remisyona giren hastalar *steroide duyarlı NS* olarak isimlendirilmektedir. Bir grup hasta ise başlangıç steroid tedavisine yanıt vermez ve *steroide dirençli NS* olarak kabul edilirler. Steroid yanıtı hastalığın prognozunu belirlemede önemli göstergelerden birisidir ve etnik faktörlerden etkilenmektedir (3).

Nedeni bilinmeyen NS patogenezi halen tam olarak aydınlatılamamıştır (1,2). Klinisyenler 1950'lerden sonra steroide dirençli nefrotik sendromların bazı ailelerde fazla olduğunu gözlemlemeye başlamışlardır. Özellikle son yıllarda bu ailelerde yapılan genetik incelemeler NS patofizyolojisinde önemli yer tutan bazı genlerdeki değişimlerin gösterilmesini sağlamıştır (4). İlk olarak konjenital Fin tipi NS'un geni bulunmuş, nefrin adı verilen proteini kodlayan *NPHS1* genindeki değişimlerin hastalığa sebep olduğu gösterilmiştir (5). 1995'te otozomal resesif steroide dirençli NS'un geninin lokalizasyonun 1q25-q31 olduğu bulunmuştur (6) ve 2000 yılında bu genin (*NPHS2* geni) kodladığı protein 'podosin' olarak adlandırılmıştır (7).

Podosin gen değişimleri çocukluk çağında başlayan, otosomal resesif geçen, hızla böbrek yetmezliğine giden steroide dirençli NS'lardan sorumlu tutulmuştur (7). Öncelikle ailevi vakalarda gen değişimleri saptanmış, son dönemlerde ise sporadik vakalarda da %10-30 arasında değişen oranlarda aynı gen değişimleri gösterilmiştir (7-10). Etnik faktörler podosin gen değişimlerinin bulunmasında rol oynamaktadır. Örneğin İtalya, Fransa, Almanya ve İsrail-Arap kökenlilerde *NPHS2* gen değişimleri gösterilirken, Japonya ve İsrail-Yahudi kökenlilerde bu gen değişimleri saptanmamıştır (8, 11-14).

NPHS2 gen değişimi taşıyan ve taşımayan NS hastalarının klinik ve histolojik özellikleri birbirine benzemektedir. Fakat iki grubun steroid tedavisine verdiği yanıt ve böbrek nakli sonrası hastalığın tekrarlama oranları farklıdır. Podosin gen değişimi taşıyan hastaların steroide direnç gösterdiği fakat böbrek nakli sonrası hastalığın düşük oranlarda tekrarladığı belirlenmiştir (15). Bu nedenle steroide dirençli NS hastalarının izleminde ve tedavilerinin planlanmasında gen analizi yapılması önem kazanmıştır.

Bu çalışmanın amacı ülkemizde görülen ailevi ve sporadik steroide dirençli NS hastalarında podosin (*NPHS2*) gen değişimlerinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nefrotik Sendrom Tanımı ve Nedenleri:

Nefrotik sendrom (NS) çocukluk çağının sık görülen, glomerül kapiller duvarının seçici geçirgen özelliğindeki değişiklikler sonucu oluşan, idrarda protein kaybı ile seyreden kronik bir böbrek hastalıklığıdır. Ağır proteinüri, hipoalbuminemi, ödem ve hiperlipidemi ile karakterize bir klinik tablodur (1). Nefrotik düzeyde proteinüri idrarla protein kaybının 50 mg/kg/gün ya da 40 mg/m²/saat' in üzerinde olması şeklinde tanımlanır. Plazma protein düzeyinin 50 g/L ve/veya albumin düzeyinin 25 g/L'nin altına düşmesi nefrotik düzeyde hipoproteinemi olarak tanımlanır (3,16). Nefrotik sendrom tek başına olan ya da sistemik hastalıklara ikincil olarak gelişebilen bir böbrek hastalığıdır. Nefrit bulgularının veya böbrek dışı hastalığın eşlik etmediği nedeni bilinmeyen nefrotik sendrom en sık görülen biçimdir (1). Tablo 2.1.'de çocukluk çağı nefrotik sendromunun nedenleri görülmektedir (1).

2.2. Epidemiyoloji ve Sınıflandırma:

Nedeni bilinmeyen NS insidansı coğrafi bölge, ırk ve yaşa göre farklılık göstermektedir (3). Amerika Birleşik Devletlerinde insidansı her 100.000 çocukta 2-2.7, prevalansı 100.000' de 16' dır (17). İngiltere'de yaşayan Asya kökenlilerde Avrupa kökenlilere göre NS insidansı 6 kat fazladır (18). Afrika'da ise hastalık daha nadir olarak görülmektedir (19). Etnik köken, histolojik tipi ve immünsüpresif yanıtı etkilemektedir. Siyah ırkta beyazlara göre steroide dirençli NS daha fazla görülmektedir (20). Nedeni bilinmeyen NS erişkin hastalarda görülen NS'ların %25'ini, çocukluk çağındaki hastaların ise %95'ini oluşturmaktadır (2,21). Tüm bu veriler hastalığın patogenezinde rol oynadığı düşünülen genetik ve çevresel faktörlerin varlığına dikkati çekmektedir.

Hastalığın ortaya çıkma yaşı genelde altta yatan histopatolojik değişikler ile ilişkilidir. Yaşamın ilk 3 ayında başlayan NS anne karnındaki enfeksiyonlara (örn sifiliz) ya da Fin tipi konjenital NS'a bağlı olabilir. Minimal değişiklik nefrotik

Tablo 2.1. Nefrotik sendrom nedenleri (1)

Nedeni bilinmeyen NS: Minimal Değişiklik Nefrotik Sendrom
Fokal Segmental Glomerulosklerоz
Membranöz nefropati

Genetik geçişli hastalıklarda görülen NS:
Fin tipi konjenital nefrotik sendrom
Fokal segmental Glomerulosklerоz
Difüz mezangial skleroz
Denys-Drash sendromu
Schimke'nin immuno-osseous displazisi
Tırnak-patella sendromu
Alport sendromu
Galloway-Mowat sendromu
Charcot-Marie-Tooth hastalığı
Jeune's sendromu
Cockayne sendromu
Bardet-Biedl sendromu
Metabolik bozukluklar: Alagille sendromu
Alfa 1 antitripsin eksikliği
Fabry hastalığı
Glutarik asidemi
Glikojen depo hastalığı
Hurler sendromu
Mitokondrial hastalıklar
Orak hücreli anemi

İkincil gelişen NS: Enfeksiyonlar: Hepatit B, C, HIV-1, sıtma, sifiliz, toksoplazmozis
İlaçlar: Penisilamin, altın, interferon, steroid dışı antienflamatuar ilaçlar, pamidronat, interferon, civa, lityum, eroin
İmmunolojik/alerjik nedenler: Castleman hastalığı, Kimura hastalığı, arı sokması, besin allerjileri
Onkolojik hastalıklar: Lenfoma, lösemi
Glomeruler hiperfiltrasyon: Oligomeganefroni, ileri derece şişmanlık, nefron sayısındaki azalmaya adaptasyon

sendrom (MDNS) genellikle 2-6 yaşlarda başlar. Fokal segmental glomerulosklerоz (FSGS) tüm çocukluk döneminde görülebilir, fakat 8 yaşın altında daha sıktır. Membranoproliferatif glomerulonefrit (MPGN), ise tipik olarak büyük çocuk ve ergenlerde görülür (2).

Nedeni bilinmeyen NS sınıflandırması iki şekilde yapılmaktadır. İlk sınıflandırma hastaların histopatolojik bulgularına göre yapılan sınıflandırmadır (3). Çocukluk çağında hastaların yaklaşık ¾'ünde minimal değişiklik nefrotik sendrom görülür (22). Histopatolojik olarak ışık ve immünofloresan mikroskobi bulguları normal olan bu hasta grubunun kendine özgü tanı koydurucu elektronmikroskobik bulguları vardır (3). Bunun dışında çocukluk çağı nedeni bilinmeyen NS'ları içinde daha az oranlarda FSGS, mezangial proliferatif glomerulonefrit (MezPGN), MPGN, membranöz nefropati (MN) gibi diğer böbrek patolojileri görülür (22). Tablo 2.2.'de çocukluk çağı NS'da histopatolojik tipler ve sıklıkları görülmektedir.

Tablo 2.2. Nedeni bilinmeyen nefrotik sendromda histopatalojik sınıflandırma

Glomerüler lezyon	**Churg ve ark[23] (n=521) (%)**	**White ve ark[24] (n=145) (%)**	**Özkaya ve ark[25] (n=392) (%)**
Minimal değişiklik nefrotik sendrom	76.4	77	76
Mezangial proliferatif glomerulonefrit	2.3	5.5	5
Fokal segmental glomerulosklerоz	6.9	7.5	6.5
Membranoproliferatif glomerulonefrit	7.5	6	10
Membranöz nefropati	1.5	1.5	1.8
Diğer	5.4	2.5	0.7

İkinci sınıflandırma ise hastaların steroid tedavisine verdiği yanıta göre yapılmaktadır. Çocukluk çağı NS'larının büyük çoğunluğu başlangıçta uygulanan 4-8 haftalık steroid tedavisine yanıt verir. Başlangıç steroid tedavisi ile remisyona giren

hastalar *steroide duyarlı NS* olarak isimlendirilmektedir (3). Yapılan çalışmalarda MDNS'un %93'ünün, FSGS' nin %30'unun, difüz mezangial proliferasyon (DMP)'nun %55'inin, MPGN'nin %7'sinin başlangıç steroid tedavisine yanıt verdiği bildirilmiştir (22). Buna karşın bir grup hasta ise başlangıç steroid tedavisine yanıt vermemektedir. Bu grup *steroide dirençli NS* olarak isimlendirilmektedir (3). Steroide duyarlı NS tanımı genellikle MDNS hastaları için kullanılır. Buna karşın diğer histopatolojik alt grupların da daha az oranlarda olsa da başlangıç steroid tedavisine yanıt verebileceği ya da steroide direçli NS hastaları içerisinde MDNS hastalarının da bulunabileceği unutulmamalıdır. Steroid yanıtı hastalığın prognozunu belirlemede önemli göstergelerden birisidir. Steroide dirençli hastalarda sıklıkla diğer immunsüpresiflere de yanıt alınamamakta ve kronik böbrek yetmezliği gelişme riski artmaktadır.

2.3. Klinik ve Laboratuar Bulguları:

Nefrotik sendrom genellikle ani başlar, ödem en sık görülen bulgudur. Sıvı tutulumu vücut ağırlığının %3-5'ni geçtiğinde ödem klinik olarak belirgin hale gelir. Genellikle başlangıçta sadece göz çevresinde görülen ödem giderek artarak tüm vücuda yayılır ve anazarka ödem olarak isimlendirilen ve tüm vücut yanısıra seröz boşluklarda da sıvı tutulumu ile karakterize NS'a özgü ödem gelişir. Nefrotik sendromda görülen ödem yumuşak kıvamda ve gode bırakan şekildedir. Kan basıncı genel olarak normaldir, fakat bazen yükselebilir. Karındaki asite bağlı karın ağrısı ve halsizlik görülebilir. Hastalarda ciddi hipovolemi, peritonit, pankreatit, tromboz ve ilaçların neden olduğu karın ağrısı da olabilir. Hızlı albümin düşüşü karın ağrısı ve dolaşım yetmezliği ile beraber şok tablosuna neden olabilir. Nefrotik sendrom nadiren rutin idrar incelemesi sırasında saptanabileceği gibi, bazen komplikasyonlarla da ortaya çıkabilir. Peritonit tablosu ile başlayabileceği gibi ilk veya tekrarlayan ataklarda derin ven trombozu, arteriyal trombozlar veya pulmoner emboli görülebilir (3,16).

Hastalarda nefrotik düzeyde proteinüri (40 mg/m²/saat) görülür. Küçük çocuklarda, 24 saatlik idrar toplama zorluğu nedeniyle, tek seferlik alınan idrar örneğinde

protein/kreatinin oranının >200 mg/mmol (ya da > 2 mg/mg) olması nefrotik düzeyde proteinüri olarak kabul edilmektedir. Mikroskopik hematüri steroide duyarlı NS hastalarının %20'sinde, steroide dirençli olgularda özellikle FSGS'li hastaların üçte ikisinde görülebilmektedir. Makroskopik hematüri nadir görülür. Genellikle lipidüri ve idrar sedimentinde hyalen silendirler izlenir. Plazma protein düzeyi 50 g/L, albumin düzeyi 25 g/L'nin bazen 10g/L'nin altına düşmektedir. Total kolesterol ve LDL kolesterol düzeyleri artar, HDL kolesterol düzeyi değişmez ya da azalır. Ağır hipoalbüminemisi olan hastarın trigliserid ve VLDL düzeyleri de artar (3,16).

2.4. Patogenez:

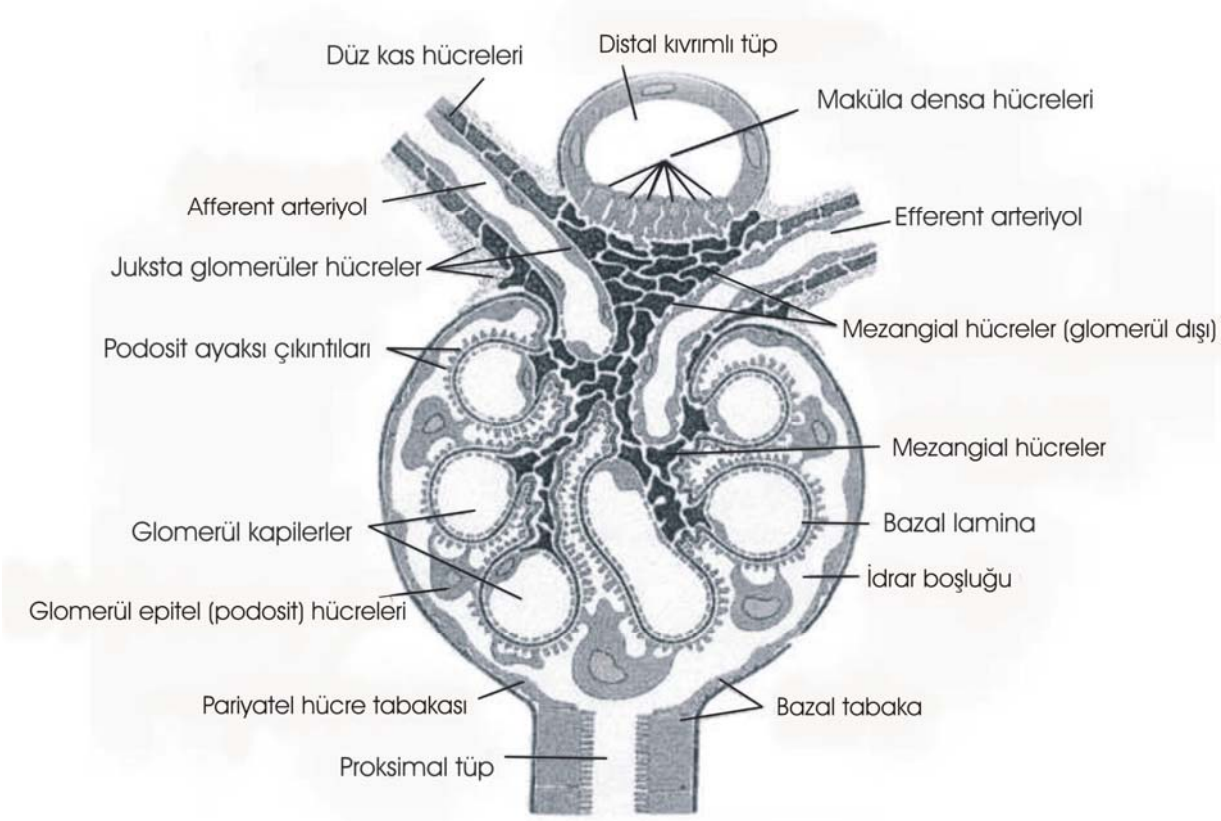
Nefrotik sendromun bulguları glomerül kapiller duvarının seçici geçirgen özelliğindeki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Nedeni bilinmeyen NS patogenezi halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Nefrotik sendroma uzun süredir immünolojik bozuklukların ve/veya bu hastaların plazmalarında bulunduğu düşünülen dolaşan geçirgenlik faktörünün neden olduğu ileri sürülmüştür. Fakat özellikle son yıllarda yapılan genetik çalışmalardan elde edilen veriler hastalığın patogenezine yeni bir bakış açısı getirmiştir (1,2,16).

Minimal değişiklik NS patogenezinde bağışıklık sisteminin kontrolünün bozulmasının (özellikle hücresel immünite) rolü olduğu düşünülmektedir. Nefrotik sendromun viral enfeksiyonlar ve atopi atakları ile ortaya çıkması ya da tekrarlaması; HLA antijenleri ve immünolojik hastalıklarla ilişkisi (lenfoma, timoma); steroid ve siklosporin A tedavisi ile düzelmesi bu verileri desteklemektedir. Kızamık sonrası uzun süreli remisyonların görülmesi bu hipotezi güçlendirmektedir (1,2). Nefrotik sendromlu hastalardan elde edilen T hücreleri kültür ortamında çoğaltıldığında bazı faktör ve faktörleri ürettiği ve bu faktörler farelere verildiğinde geçici proteinüri yaptığı gösterilmiştir (26). Minimal değişilik NS'lu hastaların bazılarında T hücre alt gruplarında ve/veya T hücre işlevlerinde bozukluklar tanımlanmıştır (2,27). Bununla birlikte halen bağışıklık sistemi ile nedeni bilinmeyen NS ilişkisi tam olarak aydınlatılamamıştır.

Diğer bir hipotez NS'da üretilen ve kanda çözünür halde bulunan bazı faktörlerin glomerüler kapiller duvarda değişiklik yaparak proteinüriye sebep olmasıdır. Dolaşan geçirgenlik faktörü olarak isimlendirilen bu moleküllerin lenfoid hücrelerden salgılandığı düşünülmektedir (1,2). Geçirgenliği etkileyen bu faktör ya da faktörlerin yapıları halen bilinmemektedir. Bazı çalışmalarda vasküler endotelyal büyüme faktörü, heparanaz ve hemopexin gibi çeşitli faktörlerin geçirgenliği arttırabileceği belirtilmiştir (2). Örneğin Brenchley (28) heparanazın heparan sülfat glukozaminoglikanlarını parçalayarak glomerül kapiller duvar geçirgenliğini arttırdığını ileri sürmüştür. Savin ve Sharma (29) tarafından FSGS hastalarının plazmalarında var olduğu düşünülen bir geçirgenlik faktörü oldukça dikkat çekmiştir. Bu faktörün kültür ortamındaki fare glomerüllerinde geçirgenliği arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca böbrek nakli sonrası FSGS'nin tekrarlamasından da bu faktör sorumlu tutulmuştur ve plazma değişiminin bu hastalarda yararlı olduğu bildirilmiştir. Podosin gen değişimleri olan hastaların plazmalarında da dolaşan geçirgenlik faktörü saptanmış ve böbrek nakli sonrası bazı hastalarda hastalığın tekrarlamasından aynı faktör sorumlu tutulmuştur (30).

2.5. Podosit Hasarı:

Yeni kanıtlar NS patogenezinde esas bozukluğun podosit düzeyinde olduğunu göstermektedir (2,3). Glomerül kapiller duvarı endotel, glomerül bazal membranı (GBM) ve podosit adı verilen viseral epitel hücrelerinden oluşmaktadır (Şekil 2.1.). Plazma ögeleri endoteldeki açıklıklardan geçip GBM'na ulaşmakta, glomerül bazal membranınından geçişleri ise moleküller büyüklük ve yüklerine göre farklılık göstermektedir. Glomerül bazal membranı esas olarak tip IV kollajen, laminin, nidojen ve heparan sülfat proteoglikanlarından oluşmaktadır. Agrin ve perlekan GBM'daki ana heparan sülfat proteoglikanlarıdır ve GBM'nın yüksek (-) yükünden sorumludurlar. Küçük moleküller GBM ve filtrasyon yarıklarından rahatlıkla geçebilmektedirler. Albumin büyüklüğündeki (69 kd) ve daha büyük proteinlerin ise GBM tarafından geçişleri sınırlandırılmaktadır (31).



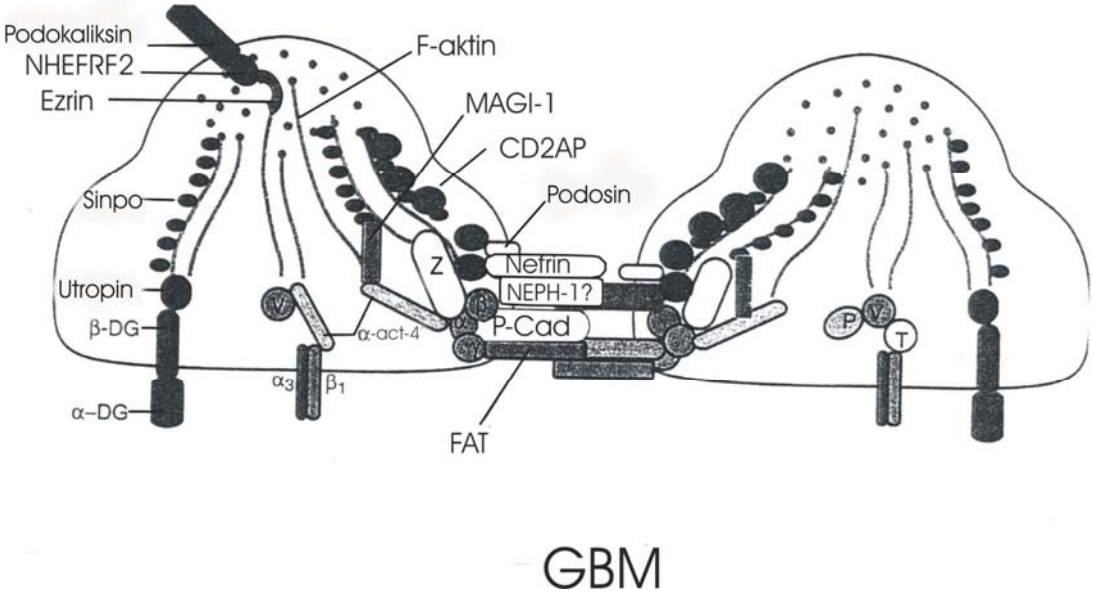
Şekil 2.1. Glomerül filtrasyon bariyerinin şematik görüntüsü

Glomerül filtrasyon bariyerinin dış yüzeyini oluştururan ve kapillerleri bal peteği şeklinde saran podositler hücre gövdesi, ana çıkıntılar ve ayaksı çıkıntılar olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır (32). Ana çıkıntıların mikrotübül ve ara liflerden oluşan bir iskelet sistemi vardır. Ana çıkıntılar podosit yapısının idamesinden ve hücre gövdesi ile ayaksı çıkıntılar arasındaki molekülerin taşınmasından sorumludurlar. Ayaksı çıkıntılar GBM ile doğrudan ilişkilidir (31). Şekil 2.2.'de podosit ayaksı çıkıntılarının moleküler yapısı görülmektedir (33).

Ayaksı çıkıntıların iskeleti aktinden zengin mikroliflerden oluşmaktadır. Bu mikrolifler ayaksı çıkıntıların uzun aksı boyunca paralel olarak uzanırlar ve sinaptopodin, α-aktinin-4 gibi aktin ilişkili proteinleri içerirler (31). α-aktinin-4 proteinini kodlayan *ACTN4* genindeki değişimler α-aktinin ve aktin liflerinin ilişkisini bozarak podositlerin mekanik özelliklerini etkiler (34). Ayaksı çıkıntılar komşu hücrelerin ayaksı çıkıntıları ile birlikte filtrasyon yarıklarını oluştururlar. Bu yarıklar diyafram ile bağlanırlar (31,35).

Ailevi NS'larda çeşitli podosit proteinlerini (nefrin, podosin, α-aktinin gibi) kodlayan genlerdeki değişimlerin saptanması ile podositler ve yarıklı diyafram ile ilgili daha fazla bilgi edinilmiştir (36,37). Nefrin, ilk bulunan yarıklı diyafram proteinidir. Nefrin 1241 aa'lik, 185 kD 'lık bir proteindir ve *NPHS1* geni tarafından kodlanmaktadır ve podositler tarafından sentezlenmektedir (5). Birbirine yakın ayaksı çıkıntılardan uzanan nefrin molekülleri yarıklı diyaframın belkemiğini oluşturmaktadırlar. Embriyonik dönemde nefrinin etkisiz hale getirildiği hayvan modellerinde yarıklı diyaframın oluşmadığı; doğumda ağır proteinürinin geliştiği ve hayvanların yaşamın ilk 24 saatinde kaybedildiği gözlenmiştir (31,36). Nefrinin bulunmasından hemen sonra Boute ve ark. (7) *NPHS2* geni tarafından kodlanan podosin proteinini tanımlamışlardır. Podosin 363 aa'lik, 42 kDa'lık bir integral membran proteinidir; podosit ayaksı çıkıntılarının zarında, yarıklı diyafram ile birleşme bölgesinde bulunur. Nefrin ve diğer podosit proteinleri (CD2AP, Neph 1) ile ilişki içerisindedir. Podosin birçok parçadan oluşmuş bu topluluğun dengede kalmasından sorumludur (31).

Podosit ayaksı çıkıntıları ve yarıklı diyaframın yapısında nefrin ve podosin dışında birçok protein tanımlanmıştır. Örneğin Neph1 nefrinle beraber yarıklı diyaframın belkemiğini oluşturmaktadır. Nefrin ve Neph1 hücre içi kinazları harekete geçiren sinyal moleküllerdir ve podosin bu sinyalleri güçlendirerek sistemin düzgün çalışmasına katkıda bulunur (38). Yarıklı diyafram proteinleri (nefrin, Neph1) ayaksı çıkıntıların aktinden oluşan iskelet sistemi ile ilişki içerisindedir. Aralarında podosin, CD2AP, ZO-1 ve katenin adı verilen proteinler bu iki oluşumu birbirine bağlamaktadırlar. Genetik hastalıklar ve hayvan modellerinden elde edilen veriler bu sistem içerisindeki her bir molekülün önemini göstermiştir. Nefrin ve Neph1 yarıklı diyaframın temel yapısını oluşturmaktadır ve bu proteinlerde oluşan bozukluk doğumdan hemen sonra görülen ağır proteinüriye sebep olmaktadır. Podosin, CD2AP ve ACTN 4 gibi bağlayıcı proteinlerde oluşan hasar ise daha hafif proteinüri ile hayatın ileriki dönemlerinde hastalık oluşturmaktadır (31).



Şekil 2.2. Podosit ayaksı çıkıntılarının moleküler yapısı

2.6. Kalıtsal Nefrotik Sendromlar:

2.6.1. Fin Tipi Konjenital Nefrotik Sendrom:

İlk kez 1956'da tanımlanmıştır (36). Otozomal resesif geçen bu hastalık özellikle Finlilerde sık olarak görülmektedir. Etkilenen bireylerde anne karnında ve yenidoğan döneminde ağır proteinüri (20-30g/gün) görülür. Hastalarda erken doğum, gelişme geriliği, infeksiyon ve böbrek yetmezliği gibi sorunlar gözlenir. Fin tipi konjenital NS kortikosteroid ve diğer immünsüpresiflere cevap vermez. Nefrektomi ve böbrek nakli yapılmazsa hastalar erken yaşta nefrotik sendromun komplikasyonları ile kaybedilirler. (4,36) Histopatolojik bulgular proksimal tüplerde görülen psödokistik genişleme ile karakterizedir. Bazen gelişmemiş glomerüller olabilir ve gelişmiş glomerüllerde mezangial hücre artışı dikkati çeker (39).

Kestila ve arkadaşları Fin tipi konjenital NS geninin 19q13. kromozomda olduğunu göstermişlerdir (5). 1998 yılında klonlanarak *NPHS1* adı verilen bu gen 26 kb büyüklüğündedir ve 29 exondan oluşmaktadır. *NPHS1* geninin kodladığı 'nefrin' adı verilen protein podositler tarafından sentezlenir ve yarıklı diyaframda bulunur (Şekil

1). *NPHS1* gen değişimi olan Fin tipi konjenital NS'lu hastaların böbreklerinde nefrin açığa çıkmamakta ve yarıklı diyafram oluşmamaktadır. Fetal insan böbreği üzerindeki çalışmalarda nefrin olmadan yarıklı diyaframın olgunlaşmasının mümkün olmadığı gösterilmiştir. Glomerüler olgunlaşma sırasında yeterli düzeyde nefrin sentezi için her iki alelde bulunan *NPHS1* geninin sağlam olması gerekirken yaşamın ilerleyen dönemlerinde tek bir çalışan alel yeterlidir. Bu nedenle Fin tipi konjenital NS geninin tek alelinde değişimi olan taşıyıcılarda anne karnında geçici proteinüri ve α - fetoprotein (AFP) testinde pozitiflik görülmektedir fakat ilerleyen dönemde böbrek fonksiyonları normal olarak seyretmektedir (31). Bugüne kadar 60'dan fazla ayrı *NPHS1* gen değişimi tanımlanmıştır (37).

2.6.2. Otozomal Resesif Steroide Dirençli Nefrotik Sendrom:

Genellikle üç ay- beş yaş arasındaki çocuklarda görülen, steroid tedavisine yanıt vermeyen, proteinüri başladıktan sonra hızla son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) gelişen bir hastalıktır. Böbrek biyopsisinde hastaların çoğunda FSGS, bir kısmında da DMP veya MDNS görülmektedir. 1995'te Fuchsuber ve arkadaşları (6) bu hastalığın geninin lokalizasyonunu 1q25-q32 olarak tanımlamışlar, 2000 yılında da Boute ve arkadaşları (7) *NPHS2* ismini verdikleri geni klonlayarak kodladığı proteine 'podosin' adını vermişlerdir.

NPHS2' nin 8 eksonluk kısa bir gen olması genetik inceleme için kolaylık oluşturmaktadır. Podosin gen değişimleri öncelikle ailevi vakalarda gösterilmiştir. İlk kez Boute ve arkadaşları (7) ailevi steroide dirençli otozomal resesif NS'u olan 14 ailede 10 ayrı *NPHS2* gen değişimi tanımlamışlardır. Daha sonra yapılan çalışmalarda ailevi olguların yaklaşık %40'ında, sporadik vakaların %10-30'unda aynı gen değişimlerinin sorumlu olduğu gösterilmiştir (8-10). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise *NPHS2* gen değişimlerinin bebeklik döneminden erişkin döneme kadar her yaş grubunda NS'a sebep olabileceği saptanmıştır (40-42). Koziell ve arkadaşları (43) tipik konjenital NS'u olan iki hastada *NPHS2* gen değişimi olduğunu göstermişler, ayrıca konjenital FSGS'si olan 4 hastada hem *NPHS1* hem de *NPHS2* gen değişimlerininin birlikte bulunduğunu bildirmişlerdir (iki genli ''digenik''

kalıtım). Bu veriler nefrin ve podosin arasındaki fonksiyonel ilişkiyi desteklemektedir.

Etnik köken podosin gen değişimlerinin insidansını etkilemektedir, örneğin İtalya, Fransa, Almanya ve İsrail-Arap kökenli steroide dirençli NS olgularında gen değişimleri gösterilirken, Japonlar ve İsrail-Yahudi kökenli steroide dirençli NS'larda gösterilememiştir (8, 11-14). Steroide duyarlı NS olgularında da podosin gen değişimleri araştırılmış ve duyarlı NS'larda podosin gen değişimlerinin bulunmadığı gösterilmiştir (10,44).

2.6.3. Otozomal Dominant Fokal Segmental Glomerüloskleroz:

Otozomal dominant FSGS erişkin dönemde ortaya çıkan, proteinüri ile seyreden, resesif forma göre daha yavaş SDBY'ne ilerleyen bir hastalıktır. *NPHS1* ve *NPHS2* ilişkili hastalıklara göre daha nadir görülür. Hastalıkla ilişkili iki bölge, 19q13 (FSGS1) ve 11q21-22 (FSGS2) tanımlanmıştır (45,46). Kaplan ve arkadaşları (47) birinci bölgede bulunan geni klonlamışlar (*ACTN4*) ve kodladığı proteinin 'α-aktinin-4' olduğunu göstermişlerdir. Alfa-aktininler aktin liflerini birleştiren proteinlerdir. İnsanlarda bilinen dört α-aktinin geni vardır. *ACTN1* ve *ACTN4* birçok dokuda bulunurken, *ACTN2* ve *ACTN3* iskelet ve kalp kasında bulunmaktadır. *ACTN4* böbrekte özellikle podositlerde bulunmaktadır. *ACTN4'* ün dominant gen değişimleri α-aktinin ve aktin liflerinin ilişkisini bozarak podositlerin mekanik özelliklerini etkilemektedir. *ACTN4* ilişkili hastalığın geçişi yüksektir fakat %100 değildir; bu ailelerde birçok bireyin hastalıkla ilişkili gen değişimlerini taşıdığı fakat proteinüri ve böbrek yetmezliği geliştirmediği bildirilmiştir (4,36).

Hastalıkla ilişkili ikinci bölgedeki gen değişimleri Winn ve ark. (48) tarafından 2005 yılında aynı aileden 20 FSGS'li bireyde saptanmıştır. Otozomal dominant geçen hastalık 3-4.dekatta ağır proteinüriye neden olmakta ve hastaların %60'ında yaklaşık 10 yıl içerisinde SDBY görülmektedir. Hastaların tümünde 11q'da TRPC6 (Transient receptor potential cation channel 6)'yı kodlayan *TRPC6* geninde missense gen değişimi göstermişlerdir. 112. pozisyondaki gen değişimi TRPC6 yoluyla gerçekleşen Ca sinyallerini artırmakta ve TRPC6 proteininin hücre içi dağılımını

bozmaktadır. Winn ve ark. bu değişikliklerin glomerül hücre fonksiyonlarını bozduklarını veya apoptozise neden olduklarını ileri sürmüşlerdir. Bu bulgular daha önce tanımlanan yapısal proteinlerde görülen genetik değişikliklerden farklı olarak NS patogenezinde diğer mekanizmalara dikkat çekmektedir. Hatta iyon kanallarına farmakolojik olarak müdahale edilebilir olması acaba gelecekte TPRC6'nın aktivitesindeki artış engellenerek ailevi ya da sporadik FSGS'ler engellenebilir mi sorusunu gündeme getirmiştir (48,49).

2.6.4. Sendromik Hastalıklar:

Podosit hastalıkları bazı kalıtsal sendromların bir parçası olarak da karşımıza çıkabilmektedirler**.** Hastalıklarla ilgili genetik bozuklukların belirlenmesi nadir görülen bu sendromların patogenezlerine yeni bir bakış açısı getirmiştir.

WT1 (Wilms tümörü baskılayıcı geni) genindeki değişimler birbirine benzeyen iki sendroma; Frasier Sendromu ve Denys-Drash Sendromu (DDS) na neden olmaktadır. Frasier Sendromu erkek yalancı hermafrodizm ve ilerleyici glomerülopati ile tanımlanır. Hastalarda normal dişi dış genital yapı, XY karyotipi, sıklıkla eşlik eden gonadoblastom bulunur. Proteinüri ve nefrotik sendrom kliniği ile bulgu veren FSGS şeklinde böbrek tutulumu ergenlik çağında veya erken yetişkin döneminde SDBY ile sonuçlanır. Denys-Drash Sendromu'da kuşkulu genitalya veya dişi fenotipi, XY karyotipi ve disgenetik gonadlar bulunur. Böbrek tutulumu genel olarak bir yaş altında bulgu veren DMS şeklindedir ve genitoüriner tümörler (Wilms tümörü) eşlik eder (39). Frasier Sendromu'nda *WT1*'in 9. intronunda, Denys-Drash Sendromu'da *WT1*'in 8. veya 9. exonunda gen değişimi vardır (50,51). *WT1* bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır, bu faktör böbrek ve gonad gelişiminde çok önemli bir role sahiptir. *WT1* olmayan farelerde bu organların gelişemediği gösterilmiştir. *WT1* erişkin böbreğinde sadece podositlerde açığa çıkmaktadır (37). Nedeni belli olmayan difüz mesengial sklerozu olan hastaların bazılarında da *WT1* geninde değişimler gösterilmiştir (52).

Tırnak-Patella Sendromu displazik tırnaklar, patellanın yokluğu ya da hipoplazisi ve böbrek hastalığı ile seyreden bir bazal membran ve podosit hastalığıdır. Bu sendromda *LMX1B* geninde (LIM-homoeodomain) değişiklik olduğu gösterilmiştir (4). FSGS ile seyreden Schimke'nin immüne-osseous displazisi ise muhtemelen podositlerde bulunan *SMARCAL1* gen değişimleri ile ilişkilidir (1). Charcot-Marie Tooth ve Galloway-Mowat Sendromu'da nefroz ve/veya FSGS'nin sıklıkla görüldüğü kalıtsal nöropatik hastalıklardır (4,39).

Tablo 2.3.'de insanlarda kalıtsal NS'a neden olan podosit bozuklukları görülmektedir.

Tablo 2.3. Nefrotik sendroma neden olan genetik podosit bozuklukları

Gen	Protein	Bölge	Kalıtım	Hastalık
NPHS1	Nephrin	19q13.1	Otozomal resesif	Fin tipi konjenital NS
NPHS2	Podosin	1q25-32	Otozomal resesif	Steroide dirençli NS
ACTN4	α-actinin-4	19q13	Otozomal dominant	FSGS1
TRPC6	TRPC6	11q21-22	Otozomal dominant	FSGS2
WT1	Wilms tümörü-baskılayıcı geni	11p13	Otozomal dominant	Frasier sendromu Denys-Drash Sendromu
LMX1B	LIM-homoeodomain Proteini	9q34	Otozomal dominant	Tırnak-patella sendromu
SMARCAL1	SW1/SNF2 ilişkili, matrix ilişkili, actin bağımlı kromatin regülatörü	2q35	Otozomal resesif	Schimke immuno-osseous displazisi

Bu hastalıklar dışında bazı podosit proteinlerinin hayvanlarda ve az sayıda insanda NS'a neden olduğu gösterilmiştir. Örneğin, CD2AP olmayan farelerde konjenital NS geliştiği ve bu farelerin 6 haftalıkken böbrek yetmezliği ile kaybedildiği gösterilmiştir (53). Kim ve ark.(54) CD2AP'de heterozigot gen değişimi olan farelerde CD2AP'nin miktarının azaldığını ve 9. ayda FSGS benzeri glomerüler değişiklikleri geliştirdiklerini göstermişlerdir. Ayrıca aynı yazarlar Afrika kökenli 2

FSGS'li hastada heterozigot CD2AP gen değişimlerini göstermişlerdir. NEPH1 proteini eksik olan farelerde de konjenital NS geliştiği gösterilmiştir (38).

Steroide duyarlı NS ise bazı ailelerde birden fazla aile bireyinde görülebilmektedir. Kromozom 1q25 bölgesinin bu hastalıkla ilişkili olduğu belirlenmiştir (44).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Nefroloji Bilim Dalı tarafından yürütülmüştür.

3.1. Çalışma Grubunun Seçimi:

Çalışma grubunu Haziran 2004 - Ocak 2005 tarihleri arasında AÜTF Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Nefroloji Bilim Dalı'nda steroide dirençli nefrotik sendrom tanısı ile izlenen hastalar oluşturmuştur.

Nefrotik sendrom ve steroide dirençli NS tanımlamaları International Study of Kidney Disease in Children'a göre yapılmıştır (22). Nefrotik sendrom, ağır proteinüri (>40 mg/m^2/st), hipoalbuminemi (<2.5 gr/dl) ve ödem ile karakterize klinik tablo olarak tanımlanmıştır. Remisyon, proteinürinin kaybolması (< 4 mg/m^2/st), steroid direnci ise 1 ay süre ile verilen 2mg/kg/gün (maksimum 60 mg) steroid tedavisine yanıt alınamama olarak tanımlanmıştır.

Her hasta için kimlik bilgileri, hastalıkla ilgili klinik ve laboratuar bulguları ve uygulanan tedavi bilgilerinin yer aldığı bir form doldurulmuştur (Ek 1). Proje için geliştirilmiş ve Ankara Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanan bilgilendirilmiş onam formları hastaların kendisi ve/veya ebeveynleri tarafından imzalanmıştır (tarih:07.06.2004, sayı:53-1302).

3.2. Laboratuar İncelemeleri:

Hastaların periferik bir veninden elde edilen kan örnekleri AÜTF Pediatrik Moleküler Genetik Laboratuarı'nda fenol kloroform yöntemiyle DNA elde etmek için kullanılmıştır. Bu çalışmada mutasyon tarama yöntemi olarak Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)- Tek zincir uygunluk polimorfizmi (Single stranded conformation polymorfism-SSCP) tekniği kullanılmıştır. Elde edilen DNA örneklerinde *NPHS2* geninin kodlayan sekiz ekzonu ve intron-ekzon bileşkeleri uygun primerler

kullanılarak bir PZR cihazında çoğaltılmış (7) ve bir dikey poliakrilamid jel elektroforezi sisteminde +4 C'de denatüre edici olmayan jel elektroforezinde yürütülmüştür. Bantlar gümüş nitrat kullanılarak görünür hale getirilmiştir. Bant farklılığı olan örnekler, "well-red" boyası ile işaretlenecekleri "dizileme döngüsü (cycle sequencing)" reaksiyonlarından sonra Beckman-Coulter CEQ2000XL otomatize edilmiş dizi analizi cihazında doğrudan dizi analizi işlemine sokulmuştur.

3.2.1. DNA İzolasyonu

Çalışma grubunu oluşturan olgulardan 1ml 0,5 M Etilendiamintetraasetikasitli (EDTA) (Sigma, ABD) prolietilen tüp içerisine 9 ml kan örneği alınmıştır. Alınan kan örneği falkon tüpü (50ml) içerisinde 25 ml kırmızı küre parçalayıcı solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya); 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya)] ile çalkalanmış, 20 dk buzda bekletilmiştir. Daha sonra +4 ºC' de 4000 rpm' de 20 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edilerek süpernatant dökülmüş, pellet üzerine tekrar 25 ml RBC lizis solüsyonu eklenmiştir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanmıştır. Son kez süpernatant döküldükten sonra dipte kalan lökositler üzerine 1000 µl RBC lizis solüsyonu eklenmiş, bu karışımın 800 µl' si ependorf tüpüne alınarak -20°C stok olarak saklanmıştır. Geriye kalan 200 µl' lik karışım başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20 µg/ml olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10' luk Sodyum Dodesil Sülfat (Merck, Almanya) ve lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu [10 mM Trisklorid (Amresco, ABD) pH: 8; 100 mM Sodyum Klorid (Merck, Almanya), 1 mM EDTA (AppliChem, Almanya) pH: 8] eklenerek bir gece 56 ºC ' de sıcak su banyosunda (Kotterman, Almanya) bekletilmiştir. İkinci gün 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya), İzoamilalkol (Merck, Almanya)] eklenerek 10 dk çalkalanmış, buz içerisinde 20 dk bekletildikten sonra +4 ºC 4000 rpm'de 20dk santrifüj edilmiştir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10' u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95' lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenmiştir. Ependorf tüpü alt-üst edilerek DNA görünür hale

getirildikten sonra -20 ◌̊C' de bir gece bekletilmiştir. Üçüncü gün +4 ◌̊C 4000 rpm'de 20dk santrifüj edilerek DNA çöktürülmüştür. Süpernatant kısmı dökülerek tüpe 500 µl %70'lik alkol eklenmiş ve +4 ◌̊C 4000 rpm'de 20dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda alkol dökülmüş ve tüp kurumaya bırakılmıştır. Kurutulduktan sonra tüp içerisine Tris-EDTA (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37 ◌̊C' de bir gece bekletilerek DNA' nın çözülmesi sağlanmıştır. İzole edilen DNA +4 ◌̊C' de saklanmıştır.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Bu çalışmada *NPHS2* geninin tüm ekzonları (8 ekzon) uygun primer çiftleri kullanılarak PZR tekniği ile çoğaltılmıştır. Yapılan PZR' de 100 ng genomik DNA ve 20pmol primer çiftleri kullanılmıştır. Diğer PZR bileşenleri; 10 mM Tris-HCl (25 °C pH: 8,8), 50 mM KCl, son konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde deoksinükleotittrifosfatlar [dATG, dGTP, dCTP, dTTP (Fermentas, Litvanya)],1 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya) ve 15 mM $MgCl_2$' dür. Toplam hacim 25 µl' ye dH_2O ile tamamlanarak PZR gerçekleştirilmiştir. Beş farklı PZR programı kullanılmıştır (Tablo 3.1.). TD1 ismi verilen programda primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı (annealing temp) 64°C'den 54°C'ye her iki siklusta bir 2 derece azaltılmak suretiyle düşürüldü. Denaturasyon ve zincir uzatma sıcaklıkları sırasıyla 94°C ve 72°C'de sabitlendi. TD2 PZR programında bağlanma sıcaklığı 5 siklus boyunca her siklusta 1 derece azaltılarak 65°C'den 60°C'ye düşürüldü. Sonraki 5 siklusta bağlanma sıcaklığı 60°C'de sabitlendi. Denaturasyon ve zincir uzatma sıcaklıkları sırasıyla 94°C ve 72°C olarak ayarlandı. TD3 PZR programı için ise bağlanma sıcaklığı 20 siklus boyunca 0.5 derece azaltılarak 70°C'den 60°C'ye düşürüldü. Sonra bağlanma süresi 20 siklus boyunca her siklusta 1 saniye arttırıldı. Denaturasyon sıcaklığı ise 94°C'de sabitlendi. Bütün çalışmalar Biometra T1 model bir 'thermocycler' kullanılarak yapıldı (Biometra, Almanya).

Tablo 3.1. *NPHS2* geni mutasyon analizinde kullanılan primerler

Forward	Reverse	Bağlanma sıcaklığı x döngüler	PZR ürün büyüklüğü
Exon 1 A 5'-GCAGCGACTCCACAGGGACT-3'	5'-GGACCTCATCCACGTCCAC-3'	62°C x 35	289 bp
B 5'-GGTGGACGTGGATGAGGTC-3'	5'-TCAGTGGGTCTCGTGGGGAT-3'	TD2	177 bp
Exon 2 5'-AGGCAGTGAATACAGTGAAG-3'	5'-GGCCTCAGGAAATTACCTA-3'	TD2	203 bp
Exon 3 5'-TTCTGGGAGTGATTTGAAAG-3'	5'-TGAAGAAATTGGCAAGTCAG-3'	TD3	168 bp
Exon 4 5'-AAGGTGAAACCCAAACAGC-3'	5'-CGGTAGGTAGACCATGGAAA-3'	TD3	204 bp
Exon 5 5'-CATAGGAAAGGAGCCCAAGA-3'	5'-TTTCAGCATATTGGCCATTA-3'	TD3	292 bp
Exon 6 5'-CTCCCACTGACATCTGA-3'	5'-AATTTAAAATGAAACCAGAA-3'	TD1	155 bp
Exon 7 5'-CTAAATCATGGCTGCACACC-3'	5'-CTTCCTAAAGGGCAGTCTGG-3'	TD3	167 bp
Exon 8 5'-GGTGAAGCCTTCAGGGAATG-3'	5'-TTCTATGGCAGGCCCCTTTA-3'	64°C x 35	380

3.2.3. SSCP için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

Bu çalışmada SSCP için kullanılacak %40' lık poliakrilamid jel, 49:1 oranında akrilamid-bisakrilamid kullanılarak hazırlanmıştır. Bunun için 380 gr Akrilamid (Merck, Almanya) ve 20 gr N,N'-metilen-bis-akrilamid (Sigma, Almanya) bir miktar distile su ile 37 ºC' de ısıtılarak kimyasalların çözünmesi sağlanmış ve hacim distile su ile 1000ml' ye tamamlanmıştır (Sambrook ve ark., 1989).

Jel yapımı için kullanılan TBE 5X solüsyonu; 54 gr Tris (Amresco, ABD), 27,5 gr Borik asit (AppliChem, Almanya), 20 ml 0,5 M pH: 8 EDTA (AppliChem, Almanya) distile su ile 1000 ml hacime tamamlanarak yapılmıştır.

Jelin polimerleşmesi için kullanılan Amonyum Persülfat %10' luk olarak 1 gr Amonyum Persülfat (AppliChem, Almanya) distile su ile 10 ml' lik hacime tamamlanarak hazırlanmıştır.

SSCP jelinin dökületeceği camlar distile su ile yıkanıp alkol ile silindikten sonra camlar arasına 1mm kalınlığında 'spacer'ler yerleştirilmiştir.

- %40' lık akrilamid-bisakrilamid stoğundan 12,34 ml,
- TBE 5X solüsyonundan 14 ml,
- distile sudan 40,16 ml

alınarak karıştırılmıştır. Karışım süzüldükten sonra vakum ile havası alınmış ve 0,6 ml %10' luk Amonyum Persülfat ve 40 µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamid) (Sigma, Almanya) eklenerek hazırlanan camlar arasına dökülmüştür. Jel döküldükten sonra 0,1 mm' lik tarak camlar arasına takılarak örneklerin yükleneceği kuyuların oluşması sağlanmıştır.

Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkartılmış ve camlar vertikal jel sistemine (BioRad, ABD) yerleştirilmiştir. PZR ürünlerine yükleme boyası (Formamid, EDTA, Xyelene Cyanol, Brom-fenol mavisi, H_20; son konsantrasyonlar sırasıyla %95, 20mM, %0,05, %0,005) eklenerek 95 °C ' de 6-7 dk denatüre edilmiş ve jele yüklenmiştir. Sisteme tampon olarak TBE 1X solüsyonu ilave edilmiştir. Örnekler 150 volt akım altında, +4 °C 'de baz çifti uzunluklarına göre 10-14 saat yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel gümüş boyama ile boyanarak bantlar görünür hale getirilmiştir.

3.2.4. Gümüş Boyama

Gümüş boyama için %1' lik gümüş nitrat, %15' lik Sodyum Hidroksit (NaOH), %7,5' lik Sodyum Bikarbonat solüsyonları kullanılmıştır. %1'lik gümüş nitrat solüsyonu 5 gr gümüş nitrat ($AgNO_3$) (AppliChem, Almanya) distile su ile 500 ml' ye tamamlanarak, %15' lik sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonu 150 gr katı sodyum hidroksit distile su ile 1000 ml' ye tamamlanarak, %7,5' lik sodyum bikarbonat (Na_2CO_3) distile su ile 1000 ml' ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Elektroforez sonrası jel, stok solüsyonundan distile su ile 9:1 oranında seyreltilerek hazırlanan

%0,1’ lik gümüş nitrat solüsyonu ile 15 dk muamele edilmiştir. Daha sonra formaldehit ilave edilmiş %1,5’ lik sodyum hidroksit solüsyonu ile boyanmıştır. Jel %0,75’ lik sodyum bikarbonat solüsyonu ile muamele edilerek boyama işlemi sonlandırılmıştır. Gümüş boyama sonrası bant farklılığı görülen örneklere DNA dizi analizi yapılmıştır.

3.2.5. DNA Dizi Analizi

Bu çalışmada nükleotit dizisinin belirlenmesi için Sanger’in enzimatik yöntemi esasına dayalı, tam otomatik kapiller sistemli çalışan bir DNA dizi analizi cihazı kullanılmıştır (CEQ2000XL, Beckman Coulter, ABD).

Gümüş boyama sonrası bant farklılığı gözlenen örneklere tekrar PZR yapılmış, daha sonra PZR ürünleri pürifikasyon işlemiyle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PZR ürünleri floresan işaretli dideoksinükleotidler ile işaretlenmesi için yeni bir PZR döngüsüne sokulmuştur. Bu işlem sırasında, ‘well red’ florasans boyalı dideoksinükleotidler ve DNA polimeraz enzimi içeren Dye terminator Cycle Squencing Kit (Beckman Coulter, USA) kullanılmıştır.

PZR bileşenleri; 12 µl premiks (her örnek için 2 µl 10X reaksiyon tamponu, 1 µl dNTP karışımı, 2 µl ddUTP, ddGTP, ddCTP, ddATP ve 1µl polimeraz enzimi), 0,5-6 µl pürifiye edilmiş PZR ürünü ve reaksiyonun tek iplikçikten yürümesi için primer çiftinin birinden 2µl (1.6 µM)’dir. Son hacim dH_2O ile 20µl’ ye tamamlanarak PZR işlemi gerçekleştirilmiştir.

PZR sıcaklık koşulları 95°C ‘de 1dk denatürasyonu takiben 30 döngü 96°C’ de 20s, 50°C’ de 20 s, 60°C’de 4dk olarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonrası reaksiyonun sonlandırılması için örneklere 2 µl NaOAc (1,5 M), 2 µl EDTA (50mM), 1µl glikojen (20mg/ml) ile hazırlanan durdurma solüsyonu eklenmiştir. Bu işlemden sonra örnekler üzerine 60 µl %95’ lik soğuk etanaol eklenerek +4°C’ de,14000 rpm’ de 2 dk santrifüj edilmiştir (Micromax RF, ABD). Üst kısım dökülerek 200 µl %70’ lik soğuk etanol eklenmiş +4°C’ de,14000 rpm’ de 2 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem

iki kez gerçekleştirildikten sonra örnekler liyofilizatör (Christ, Almanya) cihazında yüksek vakum altında 45 dk kurutulmuştur. Kurutulduktan sonra örnekler 40µl formamid ile çözülerek DNA dizi analizi cihazına yüklenmiştir. Elde edilen sonuçlar CEQ Sequencing Software programı kullanılarak dalgalar halinde görünür hale getirilmiştir.

4. SONUÇLAR

Çalışma grubunu steroide dirençli NS tanısı alan 33 farklı aileden gelen 35 hasta (16 erkek, 19 kız) oluşturdu. Bu hastaların 7 si ailevi (5 farklı aileden), 28'i sporadik NS hastasıydı.

Hastalık başlangıç yaşı 59.9±50.5 ay (2 - 192 ay) olarak bulundu.

Ondört hastanın (%40) anne-babası arasında akrabalık bulunmaktayken 21 hastanın (%60) ebeveynleri arasında akrabalık yoktu.

Hastalık başlangıcında 5 hastada hipertansiyon (%14.3), dört hastada (%11.4) makroskopik hematüri ve 16 hastada (%45.7) mikroskopik hematüri saptandı.

Böbrek biyopsi bulguları 21 hastada (%60) FSGS, 7 (%20) hastada DMP, üç (%8.57) hastada MPGN, iki (%5.7) hastada MDNS ve iki (%5.7) hastada özgül olmayan histopatolojik bulgular ile uyumluydu.

Tüm hastalara 4 hafta steroid tedavisi uygulanmış, yanıt alınamamıştı.

Yirmiiki hastada (%62.8) steroid tedavisine ek olarak siklofosfamid ya da diğer immünosüpresif ilaçlar (MMF, siklosporin, azotiopürin, klorambüsil) kullanılmış fakat yanıt alınamamıştı.

Otuzbeş hastanın 10'nunda (%28.5) steroid yan etkilerinin ortaya çıktığı görüldü. Beş hastada hipertansiyon, bir hastada katarakt, bir hastada hiperglisemi, 3 hastada şişmanlık ve 4 hastada kemiğe ait yan etkiler (osteopeni, osteoporoz) saptandı.

Çalışma sırasında 3 (%8.6) hastada kronik böbrek yetmezliği ve 5 (14.2%) hastada son dönem böbrek yetmezliği vardı. Hastaların birine (%2.9) daha önce böbrek nakli yapılmıştı. Tablo 4.1.'de çalışma grubunu oluşturan hastaların epidemiyolojik ve klinik özellikleri gösterilmiştir.

NPHS2 gen değişimi 33 ailenin dördünde (%12.1) saptandı. Yedi bireyin çalışıldığı 5 aileden üçünde (%60), 28 sporadik olgunun birinde (%3.57) *NPHS2* gen değişimi tesbit edildi. Şekil 4.1.'de tesbit edilen gen değişimleri, Tablo 4.2.'de *NPHS2* gen değişimi taşıyan hastaların klinik bulguları ve saptanan gen değişimleri gösterilmiştir.

İki kardeşte (Aile no: 4)) iki farklı gen değişimi saptandı. Kardeşlerden biri 12 yaşında FSGS tanısı alan, steroid, Mendoza protokolü, siklofosfamid ve siklosporin tedavilerine yanıt vermeyen, 14 yaşında SDBY gelişen bir erkek hastaydı. Diğer kardeş ise 7.5 yaşında DMP tanısı alan, steroid ve MMF tedavisine yanıt vermeyen, 10 yaşında SDBY gelişen bir kız hastaydı. İlk gen değişimi 5. eksonda bulunan bir missense değişim; 714. pozisyondaki guanine timine değişerek, 238. pozisyonda arjinin serin değişimine neden olmuştur [p.Arg 238 Ser]. İkinci gen değişimi 2. eksonda bulunan bir missense değişim; 353. pozisyondaki sitozin timine dönüşerek, 118. pozisyonda prolin lösin değişimine sebep olmuştur [p.Pro118 Leu].

İki kardeşte (Aile no:18) 3. ekzonda homozigot frameshift c419delG gen değişimi saptandı. Birinci hasta iki yaşında NS bulguları gelişen, böbrek biyopsisinde anlamlı bir patoloji saptanmayan bir hastaydı. Uygulanan steroid, siklofosfamid ve siklosporin tedavilerine yanıt vermeyerek, 6 yaşında SDBY gelişmişti. Kardeşi 2 aylıkken MDNS tanısı almış, uygulanan steroid tedavisine cevap vermemiş ve düzenli kontrollere gelmemişti. Bir yıllık izlem sonunda NS'u halen devam etmekteydi.

Ailevi NS öyküsü olan bir diğer hastamızda (Aile no: 11) *NPHS2* geninde 4 gen değişimi saptandı (homozigot cis pozisyonundaki p.Pro20Leu - p.Arg168His mutasyonları). Bu gen değişimini taşıyan hasta 5.5 yaşında DMP tanısı alan ve ailesinde NS bağlı kardeş ölüm öyküsü bulunan bir kız hastadır. Tanı sonrası iki yıllık izlemi bulunmaktadır; steroid, yüksek doz steroid ve siklofosfamid tedavilerine yanıt alınamamış ve hastanın NS'u halen devam etmektedir. Birinci ekzonda bulunan

bir homozigot yanlış anlamlı "missense" gen değişimi; 59. pozisyondaki sitozin timine dönüşerek 20. pozisyonda prolin lösin değişimine sebep olmuştur (p.Pro20Leu). İkinci gen değişimi 4. ekzonda bulunan bir homozigot yanlış anlamlı ‘‘missense’’ değişim; 503. pozisyondaki guanine adenine dönüşerek 168. pozisyonda arjinin histidin değişimine neden olmuştur (p.Arg168His).

Oniki aylıkken FSGS tanısı alan bir sporadik olguda (Aile no: 24) heterozigot p.Pro20Leu gen değişimi saptandı. Hasta 3 yıldır izlenmektedir ve NS'u halen devam etmektedir. Steroid, yüksek doz steroid ve siklofosfamid tedavilerine yanıt vermemiştir.

Tablo 4.1. Çalışma grubunu oluşturan hastaların özellikleri

Aile-Hasta	Cinsiyet	Akrabalık	Ailevi/ Sporadik	Yakınma başlama yaşı (ay)	HT	Hematüri	Biyopsi	Tedavi	Böbrek yetmezliği	Steroid yan etkileri	Gen değişimi
1	K	+	Sporadik	108	-	Mikroskopik	FSGS	Steroid	Yok	-	-
2	K	-	Sporadik	84	-	Mikroskopik	FSGS	Steroid PMP Siklofosfamid Siklosporin Azotiopürin	Transplant	HT	-
3	K	-	Sporadik	12	-	Mikroskopik	DMP	Steroid PMP Siklosporin	Yok	-	-
4-1	K	-	Ailevi	90	-	Mikroskopik	DMP	Steroid PMP MMF	Diyaliz	-	+
4-2	E	-	Ailevi	144	+	Mikroskopik	FSGS	Steroid PMP Siklofosfamid Siklosporin	Diyaliz	-	+

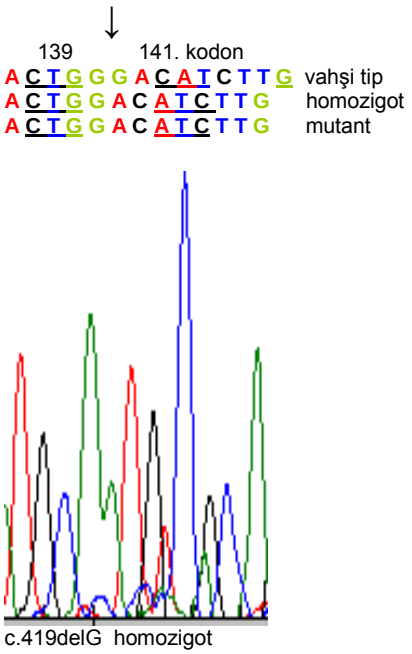
5	K	-	Sporadik	18	-	Mikroskopik	FSGS	Steroid PMP Siklofosfamid Siklosporin	Prediyaliz	HT	-
6	E	+	Sporadik	12	-	Mikroskopik	FSGS	Steroid	Yok	-	-
7	E	+	Sporadik	72	-	Yok	FSGS	Steroid PMP	Yok	-	-
8	K	+	Ailevi	18	+	Mikroskopik	DMP	Steroid	Yok	-	-
9	E	+	Sporadik	36	+	Mikroskopik	FSGS	Steroid PMP Siklosporin	Prediyaliz	Kemik	-
10	E	+	Sporadik	78	-	Yok	FSGS	Steroid PMP Siklofosfamid	Yok	-	-
11	K	+	Ailevi	66	-	Yok	DMP	Steroid PMP Siklofosfamid	Yok	-	+
12	E	+	Sporadik	120	+	Yok	FSGS	Steroid PMP Siklosporin	Yok	-	-
13	E	-	Sporadik	6	-	Yok	DMP	Steroid	Yok	-	-

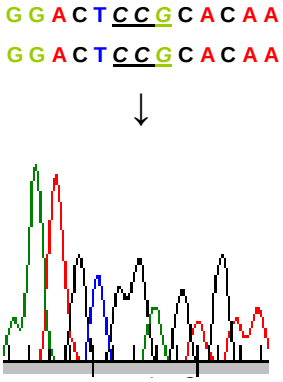
14	K	+	Sporadik	30	-	Yok	FSGS	Steroid PMP Siklofosfamid Klorambusil Siklosporin MMF	Yok	Katarakt Obesite	-
15	K	-	Sporadik	12	-	Mikroskopik	FSGS	Steroid PMP Siklofosfamid	Yok	Hiperglisemi HT	-
16	K	+	Sporadik	36	-	Yok	FSGS	Steroid PMP Siklofosfamid Siklosporin	Diyaliz	Kemik Obesite	-
17	E	+	Sporadik	36	-	Mikroskopik	FSGS	Steroid PMP MMF	Yok	-	-
18-1	E	-	Ailevi	24	-	Mikroskopik	ÖOP	Steroid Siklofosfamid Siklosporin	Diyaliz	-	+
18-2	E	-	Ailevi	2	-	Mikroskopik	MDNS	Steroid	Yok	-	+
19	E	-	Sporadik	24	-	Mikroskopik	FSGS	Steroid PMP Siklofosfamid	Yok	Kemik HT	-

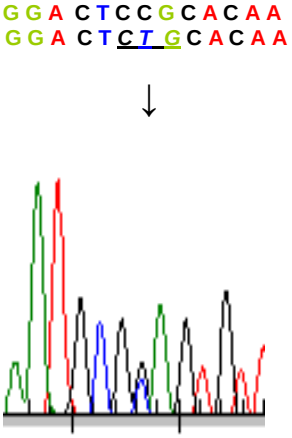
20	K	-	Sporadik	150	-	Yok	FSGS	Steroid PMP Klorambusil MMF	Yok	Obesite	-
21	K	+	Sporadik	60	-	Yok	MDNS	Steroid PMP MMF	Yok	-	-
22	E	-	Sporadik	24	-	Yok	FSGS	Steroid PMP Siklofosfamid Siklosporin	Yok	-	-
23	E	-	Sporadik	156	-	Makroskopik	MPGN	Steroid	Yok	-	-
24	K	-	Sporadik	12	-	Yok	FSGS	Steroid PMP Siklofosfamid	Yok	-	+
25	E	-	Sporadik	60	-	Makroskopik	FSGS	Steroid Siklofosfamid	Yok	-	-
26	E	-	Sporadik	42	+	Mikroskopik	FSGS	Steroid	Yok	-	-
27	K	-	Sporadik	54	-	Mikroskopik	MPGN	Steroid PMP	Yok	-	-

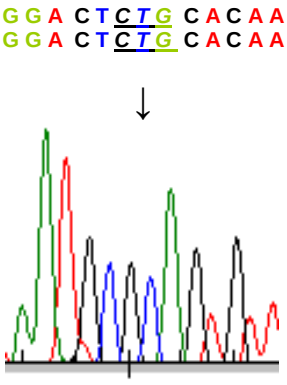
28	K	-	Ailevi	84	-	Yok	ÖOP	Steroid PMP Siklofosfamid Siklosporin	Yok	Kemik	-
29	E	+	Sporadik	84	-	Yok	FSGS	Steroid	Yok		-
30	K	-	Sporadik	132	-	Yok	MPGN	Steroid PMP Siklofosfamid Kaptopril	Diyaliz	HT	-
31	K	+	Sporadik	192	-	Yok	FSGS	Steroid	Prediyaliz	-	-
32	K	-	Sporadik	18	-	Makroskopik	DMP	Steroid PMP	Yok	-	-
33	K	-	Sporadik	2	-	Makroskopik	DMP	Steroid	Yok	-	-

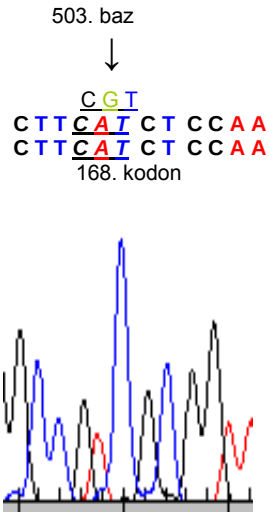
FSGS: Fokal segmental glomeruloskleroz, DMP: Difüz mezangial proliferasyon, , ÖOP: Özgül olmayan patoloji, MDNS: Minimal değişiklik nefrotik sendrom
HT: Hipertansiyon PMP: Pulse metilprednizolon
MMF: Mikofenolat mofetil











Şekil 4.1. Saptanan gen değişimleri

Tablo 4.2. *NPHS2* gen değişimi saptanan hastalar

Aile	Hasta	Ailevi / sporadik	Böbrek biyopsisi	Gen değişimi (DNA)	Gen değişimi (Protein)
4	1 2	Ailevi Ailevi	DMP FSGS	Bileşik heterozigot c. [714G>T] + [353C>T]	Bileşik heterozigot p. [Arg 238 Ser] + [Pro118 Leu]
11	1	Ailevi	DMP	Homozigot c.[59C>T;503G>A]	Homozigot p. [Pro20Leu;Arg168His]
18	1 2	Ailevi Ailevi	ÖOP MDNS	Homozigot c. [419delG] +[419delG]	Homozigot p.[Gly140fs] + [Gly140fs]
24	1	Sporadik	FSGS	Heterozigot c. [59C>T] + [=]	Heterozigot p. [Pro20Leu] + [=]

DMP: Difüz mezangial proliferasyon, FSGS: Fokal segmental glomeruloskleroz, ÖOP: Özgül olmayan histopatolojik bulgu, MDNS: Minimal değişiklik nefrotik sendrom

5. BULGULARIN ÖZETİ

Otuzbeş hastanın 10'nunda (%28.5) steroid yan etkilerinin ortaya çıktığı görüldü.

NPHS2 gen değişimi 33 ailenin dördünde (%12.1) saptandı.

NPHS2 gen değişimi yedi bireyin çalışıldığı 5 aileden üçünde (%60) saptandı.

NPHS2 gen değişimi 28 sporadik olgunun birinde (%3.57) tesbit edildi.

İki kardeşte (Aile no: 4) p. [Arg 238 Ser] + [Pro118 Leu] gen değişimi saptandı. Hastalardan birisi 12 yaşında FSGS, diğeri 7.5 yaşında DMP tanısı almıştı.

İki kardeşte (Aile no:18) 3. ekzonda homozigot frameshift c.419delG gen değişimi saptandı. Kardeşlerden birisi 2 yaşında NS bulguları ortaya çıkan, biyopsisinde anlamlı patoloji bulunmayan, diğeri 2 aylıkken MDNS tanısı alan hastalardı.

Ailevi NS öyküsü olan, 5.5 yaşında DMP tanısı alan bir hastamızda (Aile no: 11) *NPHS2* geninde 4 gen değişimi saptandı (homozigot cis pozisyonundaki p.Pro20Leu - p.Arg168His mutasyonları).

Oniki aylıkken FSGS tanısı alan bir sporadik olguda (Aile no: 24) heterozigot p.Pro20Leu gen değişimi saptandı.

6. TARTIŞMA

Proteinüri ve nefrotik sendrom tablosuyla ortaya çıkan, SDBY geliştirebilen**,** önemli mortalite ve morbidite nedeni olan glomerüler hastalıkların etyolojisi uzun süreden beri araştırılmaktadır. Son yıllarda özellikle ailevi vakalarda yapılan genetik çalışmalar glomerüler filtrasyon bariyerinin yapısının ve kalıtsal NS'un patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (4,16,37,55,56).

Otozomal resesif steroide dirençli nefrotik sendrom genellikle üç ay ile beş yaş arasındaki çocuklarda görülen, steroid tedavisine yanıt vermeyen, proteinüri başladıktan sonra hızla SDBY gelişen bir hastalıktır (4,15). 1995'te Fuchsuber ve arkadaşları bu hastalığın geninin lokalizasyonunu 1q25-q32 olarak tanımlamışlar (6), 2000 yılında da Boute ve arkadaşları *NPHS2* ismini verdikleri geni klonlayarak kodladığı proteine 'podosin' adını vermişlerdir (7). Daha sonra çeşitli Avrupa, Orta Doğu ve Uzak Doğu ülkelerinde ailevi ve sporadik SDNS olgularında *NPHS2* gen değişimleri araştırılmıştır (8-14,57). Çalışmamız Türkiye'de ailevi ve sporadik steroide dirençli NS olgularında podosin gen değişimlerinin araştırıldığı ilk sistematik araştırmadır. Bu çalışmada steroide dirençli NS hastası olan otuzüç birbirinden bağımsız ailenin dördünde 5 farklı podosin gen değişimi bulunmuştur. Ailevi steroide dirençli NS'u olan 5 aileden üçünde (%60), 28 sporadik olgunun birinde (% 3.5) podosin gen değişimleri saptanmıştır.

Boute ve arkadaşlarının (7) yaptıkları çalışmada ailevi steroide dirençli otozomal resesif NS'u olan 16 ailenin 14'ünde 10 ayrı *NPHS2* gen değişimi tanımlanmıştır. Karle ve ark.(8) Almanya'da steroide dirençli NS'u olan 27 ailenin 12'sinde (%46) podosin gen değişimlerini göstermişlerdir. Bu iki çalışmada p.Arg138Gln en sık karşılaşılan değişim tipi olmuştur. Frishberg ve arkadaşları (13) İsrail Arap kökenli iki ailenin on çocuğunda aynı *NPHS2* gen değişimini p.Arg138X tesbit etmişlerdir. Weber ve arkadaşları (12) çoğunluğu Fransa ve kuzey Afrika ülkelerindeki hastaları içeren çalışma grubunda 81 ailede %43 oranında podosin gen değişimlerini göstermişlerdir. Yayınlarda daha önce Türk ırkından ailevi hastalarda *NPHS2* gen değişimlerinin varlığı vaka takdimleri şeklinde tanımlanmıştır (58-60). Bizim

çalışmamızda ailevi olgularda podosin gen değişimlerinin %60 gibi yüksek oranda saptanmış olması ülkemizdeki ailevi SDNS olgularında *NPHS2* gen değişimi aranması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Ailevi olguların yanısıra çeşitli Avrupa ülkelerinde, Amerika ve bazı uzak doğu ülkelerinde sporadik olgularda da podosin gen değişimleri araştırılmış ve değişik oranlarda saptanmıştır (8,10,11,13,14,57,61). Karle ve ark. (8) Almanya'da sporadik SDNS olgularının %28'inde *NPHS2* gen değişimi bulmuşlardır. 2003 yılında yayınlanan bir makalede İtalya'da steroide dirençli sporadik NS olgularında homozigot podosin gen değişimleri %12 oranında saptanmıştır (11). Ruf ve ark.(10) farklı etnik gruplardan 152 sporadik olgunun %19'unda *NPHS2* gen değişimlerini göstermiştir. Weber ve ark. (12) çoğunluğu Avrupa ve Kuzey Afrika kökenli 172 sporadik olguda %10.5 oranında podosin gen değişimi saptamışlardır. İsrail'de Arap kökenli 18 sporadik vakanın altısında (%33) ailevi olgularda tesbit edilen aynı değişim (p.Arg138X) saptanmıştır (13). Aynı çalışmada Yahudi kökenli 13 sporadik olguda ise *NPHS2* değişikliklerine rastlanmamıştır. Japonya'da SDNS ya da ağır proteinüri nedeni ile kronik böbrek yetmezliği gelişen 36 sporadik olguda genetik inceleme yapılmış ve *NPHS2* gen değişimlerine rastlanmamıştır, ayrıca şu ana kadar Japonya'dan ailevi gen değişimi taşıyan hasta da bildirilmemiştir (14). Çin'de ise 23 sporadik SDNS olgusunun birinde (%4) heterozigot p.Leu361Pro gen değişimi gösterilmiştir (57). Sonuç olarak *NPHS2* gen değişimlerinin steroide dirençli ailevi ve sporadik NS' ların bir kısmından sorumlu genetik bozukluk olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bunun yanısıra etnik faktörlerin gen değişimlerinin sıklığında önemli rol oynadığı da belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda, sporadik steroide dirençli NS hastaların bir bölümünde Avrupa ülkelerindeki kadar yüksek sıklıkta olmasa da podosin gen değişimlerinin bulunabileceği gösterilmiştir.

Podosin gen değişimleri öncelikle çocukluk döneminde görülen otozomal resesif SDNS olgularında tanımlanmıştır. Sonraki çalışmalar ile erişkin dönemde görülen NS olgularında ve konjenital NS olgularında da bu gen değişimleri gösterilmiştir (40-42). Tsugaguchi ve ark.(41) erişkin dönemde bulgu veren 30 aileden 9'unda, Caridi ve ark.(42) ise 64 erişkin sporadik SDNS olgusunun üçünde podosin gen

değişimlerini saptamışlardır. Ruf ve ark.(10) 22 konjenital NS'u olan hastanın 14'ünde homozigot ya da bileşik heterozigot podosin gen değişimlerini saptamışlardır. İlginç olarak, Koziell ve ark.(43) ilk kez üç aileden 4 bireyde hem *NPHS1* hem de *NPHS2* gen değişimlerini göstermişlerdir. Bu hastalarda digenik kalıtımın histolojik fenotipi konjenital Fin tipi NS'dan konjenital FSGS'ye dönüştürdüğü düşünülmüştür. Schultheiss ve ark. (40) ise 5 sporadik NS'lu hastada digenik kalıtımı göstermişlerdir. Bu hastaların dördünde homozigot *NPHS1* gen değişimi ve beraberinde heterozigot *NPHS2* gen değişimi; birinde ise heterozigot *NPHS1* gen değişimi ve beraberinde homozigot *NPHS2* gen değişimi saptanmıştır. Fakat araştırmacılar digenik kalıtım gösteren hastalar ile diğerleri arasında genotip fenotip ilişkisi açısından farklılık bulmamışlardır.

Fuchsuber ve ark. (44) steroid yanıtı olan ailevi NS olgularında, Frishberg ve ark. (13) ise Yahudi ve Arap kökenli 15 steroid yanıtı olan sporadik FSGS'li olguda *NPHS2* gen değişimlerini araştırmışlar fakat hiçbirinde *NPHS2* gen değişimine rastlamamışlardır. Ruf ve ark'da (10) 124 steroide duyarlı hastada homozigot ya da bileşik heterozigot podosin gen değişimi bulmamışlardır. Ayrıca Weber ve ark (12) *WT1* (-) 19 DMS olgusunda da *NPHS2* gen değişimlerini araştırmış, hiçbir hastada gen değişimi saptamamışlardır. Sonuç olarak steroid yanıtı olan ailevi ve sporadik NS hastaları ile histopatolojik tanısı DMS olan hastalarda *NPHS2* gen değişimleri gösterilememiştir.

Çalışmamızda iki farklı hastada p.Pro20Leu gen değişimi saptanmıştır (Aile 11 ve 24). İlginç olarak bir ailevi olguda homozigot p.Pro20Leu gen değişimi ve homozigot p.Arg168His gen değişiminin birlikte bulunduğu gösterilmiştir (Aile 11, hasta 1). İki *NPHS2* değişiminin, aynı alelde '***cis'*** pozisyonunda, homozigot olarak saptanması insan patolojilerinde nadir rastlanan bir durumdur. Bu kompleks haplotip daha önce Türkiye'den iki ayrı ailenin üç çocuğunda tanımlanmıştır (59). Caridi ve ark. tarafından yayınlanan bu üç çocuğun ortak özellikleri erken yaşta bulgu vermeleri (ilk 6 ayda), hastalıklarının steroide dirençli seyretmesi ve hepsinde histopatolojik olarak FSGS saptanmasıdır. Çalışmamızda aynı gen değişimlerini saptadığımız hastamızın patolojik tanısı DMP'du ve hastalık bulguları 5.5 yaşında

ortaya çıkmıştı. Caridi ve ark. (59) p.Pro20Leu'nin Avrupa'da bilinen eski bir gen değişimi olduğunu, p.Arg168His'nin sonradan oluştuğunu ve Türkiye'ye özgül bir gen değişimi olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca bu kompleks haplotipin ağır hastalığa sebep olduğunu ve çok erken yaşta bulgu verdiğini ileri sürmüşlerdir. Bizim hastamızda bulguların 5.5 yaş gibi daha geç yaşta ortaya çıkması aynı genotipe sahip hastaların farklı fenotipik özelliklerinin olabileceğinin bir göstergesidir.

p.Pro20Leu gen değişimin saptadığımız diğer olgu 12 aylıkken FSGS saptanan sporadik bir olgudur (Aile 24, hasta 1). Bu hastada p.Pro20Leu gen değişimi heterozigot olarak saptanmıştır. Boute ve ark (7) homozigot p.Pro20Leu gen değişimini ilk kez 2000 yılında geni bulduklarında ailevi olgulardan birinde tanımlamışlardır. Caridi ve ark. (11) heterozigot p.Pro20Leu gen değişimini kliniği daha iyi seyirli 5 çocukta göstermişlerdir. Ruf ve ark.(10) iki sağlıklı kontrol hastasında homozigot p.Pro20Leu gen değişimini saptadıkları için bu değişimi polimorfizm olarak kabul etmişlerdir. Weber ve ark (12) ise p.Pro20Leu gen değişimlerini hastalık etkeni olarak tanımlamışlar ve heterozigot *NPHS2* gen değişimleri olan hastaların klinik bulgularının daha geç yaşlarda ortaya çıktığını ve hastalıklarının daha hafif seyirli olduğunu bildirmişlerdir. Genel anlamda heterozigot *NPHS2* gen değişimlerinin otozomal resesif geçen bir hastalıkta nasıl hastalığa sebep oldukları bilinmemektedir. Bazı yazarlar heterozigot gen değişimine sahip hastalarda belirlenememiş başka *NPHS2* gen değişimlerinin olabileceğini ya da ikinci değişimin promoter bölgede veya intronda olabileceğini ileri sürmüşlerdir (10). Bir başka olasılık ise NS patogenezinde aynı anda farklı genlerin birlikte rol oynaması olasılığıdır. Bu hastaların en azından bir bölümünde Koziell ve ark. (43) gösterdiği gibi iki genli kalıtım hastalığın gelişmesine neden olabilir. Heterozigot p.Pro20Leu mutasyonu olan ve 12 ay gibi erken dönemde klinik bulgu veren bizim hastamızda da bu iki mekanizmadan birinin rol alması muhtemel gibi görünmektedir.

Weber ve ark. (12) 2004 yılında yayınladıkları makalede *NPHS2* gen değişimleri olan hastalarda genotip fenotip ilişkisini belirlemeye çalışmışlardır. Bu çalışmada

ailevi olguların sporadik olgulara göre, homozigot ya da bileşik heterozigot gen değişimi olan hastaların heterozigot gen değişimi olan hastalara göre daha erken yaşta klinik bulgu verdiği gösterilmiştir. Frameshif veya nonsense gen değişimi olan hastalarda (homozigot/bileşik heterozigot) ve p.Arg138Gln gen eğişimi olan hastalarda klinik bulguların daha erken yaşta başladığı belirtilmiştir. p.Arg138Gln bu çalışmada en sık rastlanan gen değişimidir (%32) ve homozigot p.Arg138Gln gen değişimi olan hastaların ortalama hastalık başlangıç yaşı bir yaş altında bulunmuştur. Bazı missense gen değişimlerinin daha hafif klinik bulgularla seyrettiği, p.Val180Met ve p.Arg238Ser gen değişimi taşıyan hastalarda klinik bulguların daha geç yaşlarda ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bizim hastalarımızdan iki kardeşte homozigot frameshift c419delG gen değişimi saptanmıştır (Aile 18, hasta 1-2). Bu hastaların hastalık başlangıç yaşları 2 ay ve 2 yıldır. p. [Arg 238 Ser] + [Pro118 Leu] gen değişimlerine sahip iki hastada ise hastalık geç yaşlarda ortaya çıkmıştır (Aile 4, hasta 1-2). Bu bulgular Weber'in genotip fenotip ilişkisi ile uyumlu görünmektedir.

Klinik uygulamalarda *NPHS2* gen değişimi değerlendirilmesi birçok yarar sağlamaktadır. Sporadik NS olup, *NPHS2* değişimi taşıyan hastaların bulguları yenidoğan döneminde, çocukluk ya da erişkin dönemde ortaya çıkabilmektedir (7,40-42). Ayrıca histopatolojik olarak FSGS, MDNS veya DMP tanılarını alabilmektedirler (13,61). Bu hastaların klinik ve histolojik özellikleri *NPHS2* gen değişimi taşımayan hastalarla benzer özellikler göstermektedir. Nefrotik sendrom tanısı alan tüm çocuk hastalara birçok yan etkisi olmasına karşın steroid tedavisi ilk seçenek olarak uygulanmaktadır. Başlangıçta steroid tedavisine yanıt vermeyen ve steroide dirençli kabul edilen hastalarda da yanına eklenen diğer bir immünosüpresif ilaç ile steroid tedavisine devam edilmektedir (62). Böylece hastalar büyüme geriliği, katarakt, glokom, hipertansiyon, hiperglisemi, osteoporoz gibi çeşitli steroid yan etkileri ile karşı karşıya kalabilmektedirler. Bizim hastalarımızın yaklaşık %30'unda da steroid yan etkileri görülmüştür. Oysaki SDNS tanısı alan hastalarda genetik analiz yapılması tedavinin planlanması açısından öncelikle gündeme gelmelidir. *NPHS2* mutasyonu taşıyan hastaların belirlenmesi ile gereksiz ve önemli yan etkileri olan steroid tedavisinden kaçınılabilinir ve hastalar steroidin yan etkilerinden korunmuş olurlar.

Steroide dirençli FSGS'lerin büyük çoğunluğunda diğer immünsüpresiflere de yanıt alınamamaktadır. Frishberg ve ark. (13) *NPHS2* gen değişimi taşıyan 13 hastada sikloporin ve siklofosfamid kullanmışlar fakat yanıt alamamışlardır. Caridi ve ark (11) homozigot ya da bileşik heterozigot *NPHS2* gen değişimi olan 8 hastanın siklosporin tedavisine yanıtsız olduklarını bildirmişlerdir. Podosin gen değişimi taşıyan bizim hastalarımızdan 4'üne siklofosfamid, ikisine siklosporin, ikisine Mendoza protokolü ve birine MMF tedavisi uygulanmış fakat hiçbirisinde yanıt alınamamıştır. Hastalığın patogenezine bakıldığında podosin proteininde oluşan moleküler hasarın immünsüpresif tedavi ile düzeltilmesi mümkün gibi görünmemektedir. Ruf ve ark.(10) ise sikloporin ve siklofosfamid tedavilerini alan 29 hastanın 24'ünde remisyon olmadığını, 5 hastada ise kısmi yanıt alındığını bildirmişlerdir. Yazarlar bu yanıtı; FSGS patogenezinde rolü olabileceği düşünülen böbrek dışı mekanizmalara bağlamışlardır.

NPHS2 mutasyonu taşıyan hastaların steroid tedavisine ve diğer immünosüpresiflere yanıt vermemeleri nedeniyle bu hastalarda öncelikle düşünülmesi gereken tedavi yaklaşımı böbrek nakli olmalıdır. Bilindiği gibi idyopatik FSGS'ler nakil sonrası %25 oranında tekrarlamaktır (1). Yapılan çalışmalarda *NPHS2* geninde değişim olan NS'lu hastalarda böbrek nakli sonrası hastalığın tekrarlamadığı ya da düşük oranda tekrarladığı bildirilmiştir (7,8). Ruf ve ark.(10) podosin gen değişimi taşımayan hastaların nakil sonrası tekrarlama oranını %35, podosin gen değişimi taşıyan hastaların tekrarlama oranını %8 olarak bildirmişlerdir. Weber ve ark.(12) homozigot ve bileşik heterozigot gen değişimi olan hastaların tekrarlama oranını düşük bulmuşlar fakat heterozigot gen değişimi olan 5 sporadik olgunun üçünde nakil sonrası hastalığın tekrarladığını göstermişlerdir. Buna karşın, Berteli ve ark (63) *NPHS2* gen değişimi olan ve olmayan hastalarda nakil sonrası tekrarlama oranını benzer şekilde bulmuşlar, 9 homozigot hastanın ikisinde, 4 heterozigot gen değişimi olan hastanın üçünde hastalığın tekrarladığını bildirmişlerdir. Bu nedenle heterozigot *NPHS2* gen değişimine sahip hastaların tekrarlama oranlarının daha fazla olduğu kanısına varılmıştır. Nakil sonrası hastalığın tekrarlamasından daha önce olmayan podosin proteini ile ilk kez karşılaşan bireyin verdiği immünolojik yanıtın ya da dolaşımda bulunduğu düşünülen geçirgenlik faktörünün sorumlu olabileceği

düşünülmüştür (12). Tüm bu veriler NS patogenezinin gerçekten karmaşık olduğunu, hastalığın ortaya çıkışından genetik yatkınlığın ve beraberinde böbrek dışı nedenlerin sorumlu olabileceğini akla getirmektedir.

Podosin gen değişimi olan hastaların nakil sonrası hastalıklarının tekrarlamaması ya da düşük oranda tekrarlaması bu hastalar için tedavi planlanmasında prognozu önemli ölçüde etkileyecek bir veridir. Bunun yanısıra böbrek nakli için vericilerin büyük olasılıkla aileden olduğunu düşünülürse etkilenmemiş birey seçimi açısından bugün için genetik analiz son derece önemlidir. Yayınlarda, bu genetik bozukluklar tanımlanmadan önce, kardeşine böbrek verdikten sonra izlemde FSGS ve SDBY gelişen vaka bildirilmiştir (64). Ayrıca steroide dirençli NS'lu çocuğu olan bir ailede gen değişimlerinin araştırılması doğum öncesi tanı, taşıyıcıların tespit edilmesi ve genetik danışma imkanı sağlar.

Kalıtsal podosit hastalıklarının tanınması NS patogenezinin aydınlanmasında önemli mesafeler alınmasını sağlamıştır. Bunun dışında hastaların tedavilerinin planlanması ve izlemlerine de büyük katkısı olmuştur. Fakat halen hastalığın patogenezi tam olarak açığa kavuşmamıştır. Çeşitli ülkelerde ailevi olguların yaklaşık yarısında, sporadik olguların ise %10-30'unda podosin gen değişimleri gösterilmiştir (8-10). Bazı ırklarda gen değişimleri saptanmamış ya da düşük oranda tesbit edilmiştir (14,57). Tüm bunlar bilinmeyen başka genler ve proteinlerin NS patogenezinden sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Yakın gelecekte genetik bilimindeki ilerlemeler sayesinde, bilinmeyen sorular açıklığa kavuşacak ve hastalığın patogenezinin tam olarak aydınlanması mümkün olacaktır. Tüm bu gelişmeler hastalığa yaklaşım, tanı ve tedavisine yönelik önemli ilerlemeler sağlayacaktır.

7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

NPHS2 gen değişimleri steroide dirençli ailevi ve sporadik NS' ların bir kısmından sorumlu genetik bozukluktur ve etnik faktörler gen değişimlerinin sıklığında önemli rol oynamaktadır.

Türkiye'deki ailevi SDNS olgularında podosin gen değişimlerinin %60 gibi yüksek oranda saptanmış olması ülkemizdeki ailevi SDNS olgularında *NPHS2* gen değişimi aranması gerekliliğini göstermektedir.

Ülkemizdeki sporadik SDNS hastalarının bir bölümünde, Avrupa ülkelerindeki kadar yüksek sıklıkta olmasa da, podosin gen değişimlerinin bulunabileceği gösterilmiştir.

Bir ailevi olguda homozigot p.Pro20Leu ve homozigot p.Arg168His gen değişimi birlikte saptandı. Aynı gen değişiminleri daha önce farklı klinik ve patolojik bulgulara sahip Türk hastalarda tanımlanmıştı. Bu bulgu aynı genotipe sahip hastaların ne kadar farklı fenotipik özelliklerinin olabileceğinin bir göstergesidir.

Heterozigot p.Pro20Leu mutasyonu olan ve 12 ay gibi erken dönemde klinik bulgu veren bir hastamızın olması, hastalığın patogenezinde tesbit edilememiş başka *NPHS2* gen değişimlerinin rolü olabileceğini ya da aynı anda farklı genlerin birlikte rol oynaması olasılığını akla getirmektedir.

Steroide dirençli nefrotik sendrom tanısı alan hastalarda genetik analiz yapılması tedavinin planlanması açısından öncelikle gündeme gelmelidir. *NPHS2* gen değişimi taşıyan hastaların belirlenmesi ile gereksiz ve önemli yan etkileri olan steroid tedavisinden kaçınılabilinir ve hastalar steroidin yan etkilerinden korunmuş olurlar.

ÖZET

AİLEVİ VE SPORADİK STEROİDE DİRENÇLİ NEFROTİK SENDROM OLGULARINDA PODOSİN GEN DEĞİŞİMLERİ

NPHS2 geninin bulunmasından sonra yapılan çeşitli çalışmalarda ailevi ve sporadik steroide dirençli nefrotik sendrom olgularında sıklıkla bu gen değişimleri saptanmıştır. Etnik faktörlerin gen değişimlerinin bulunmasında önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Türkiye'deki podosin gen değişimi sıklığı bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı ülkemizde görülen ailevi ve sporadik steroide dirençli NS hastalarında podosin (*NPHS2*) gen değişimlerinin araştırılmasıdır.

Çalışma grubunu SDNS tanısı alan 33 ayrı aileden gelen 35 hasta oluşturdu. Beş ayrı aileden gelen 7 ailevi NS hastası ve 28 sporadik NS hastası çalışmaya alındı. Bu çalışmada mutasyon tarama yöntemi olarak Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)- Tek zincir uygunluk polimorfizmi (Single stranded conformation polymorfism-SSCP) tekniği kullanılmıştır, sonrasında doğrudan dizi analizi işlemi yapılmıştır.

Otuzüç ailenin dördünde (%12.1) beş farklı *NPHS2* gen değişimi saptandı. Üç farklı aileden 5 olguda (%60) ve bir sporadik olguda (%3.57) podosin gen değişimi tesbit edildi. Saptanan gen değişimleri homozigot c.419delG, bileşik heterozigot p.[Arg 238 Ser] + [Pro118 Leu], homozigot p.[Pro20leu; Arg168His] ve heterozigot p.Pro20Leu 'dir.

Podosin gen değişimleri Türkiye'deki bazı SDNS olgularında, özellikle ailevi olgularda, gösterilmiştir. Ayrıca, sonuçlarımız aynı genotipe sahip hastalarda farklı fenotipik özelliklerin olabileceğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: nefrotik sendrom, *NPHS2* gen değişimleri, podosin, steroide dirençli nefrotik sendrom, Türk.

SUMMARY

Analysis of *NPHS2* mutations in familial and sporadic steroid resistant nephrotic syndrome patients

Since the identification of the *NPHS2* gene, various studies have demonstrated that *NPHS2* mutation is a frequent cause of familial and sporadic steroid resistant nephrotic syndrome (SRNS). Inter-ethnic differences were suggested to play a role in the incidence of these mutations. The frequency and spectrum of podocin mutations in Turkey have remained largely unknown. The aim of this study was to screen for podocin mutations in Turkish patients with SRNS.

We examined 35 patients from 3 unrelated families with SRNS. There were 7 familial cases from five different families and 28 sporadic cases. *NPHS2* gene analysis was performed using the polymerase chain reaction – single strand conformational polymorphism protocols followed by direct sequencing.

Five different *NPHS2* mutations were detected in 4/33 of families (12.1%) studied; 5 familial cases coming from three unrelated families (60%) and one sporadic case (3.57%) were found to carry podocin mutations. The detected mutations included homozygous c. 419delG, compound heterozygous p.[Arg 238 Ser] + [Pro118 Leu], homozygous p.[Pro20leu; Arg168His] and heterozygous p.Pro20Leu.

Podocin mutations are responsible for some of the SRNS cases in Turkey, especially when there is more than one affected person in the family. Our results also suggested the presence of a wide range of phenotypic variability between individuals with the same genotype.

Key words: nephrotic syndrome, *NPHS2* mutations, podocin, steroid resistant nephrotic syndrome, Turkish

KAYNAKLAR

1. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet* 2003;362: 629-639

2. Bagga A, Mantan M. Nephrotic syndrome in children. *Indian J Med Res* 2005;122:13-28

3. Niaudet P. Steroid - sensitive idiopathic nephrotic syndrome in children. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, eds. *Pediatric Nephrology*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams&Wilkins, 2004: 543-556

4. Pollak MR. The genetic basis of FSGS and steroid resistant nephrosis. *Seminars in Nephrol* 2003;23:141-146

5. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaalo H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinene M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmerg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein –nephrin is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998;1:575-582

6. Fuchshuber A, Jean G, Gribouval O, Gubler MC, Broyer M, Beckmann JS, Niaudet P, Antignac . Mapping a gene (SRN1) to chromosome 1q25-q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive steroid resistant nephrotic syndrome. *Hum Mol Genet* 1995;4:2155-2158

7. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C. *NPHS2*, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant neprotic syndrome. *Nat Genet* 2000;24: 349-354

8. Karle SM, Uetz B, Ronner V, Glaeser L, Hildebrandt F, Fuchshuber A. Novel mutations in *NPHS2* detected in both familial and sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002;13: 388-393

9. Caridi G, Berteli R, Carrea A, Di Duca M, Catarsi P, Artero M, Carraro M, Seri M, Ginevri F, Perfumo F, Ghiggeri GM. Prevalence, genetics and clinical features of patients carrying podocin mutations in steroid resistant nonfamilial focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12: 2742-2746

10. Ruf RG, Lichtenberger A, Karle SM, Haas JP, Anacleto FE, Schultheiss M, Zalewski I, Imm A, Ruf EM, Mucha B, Bagga A, Neuhaus T, Fuchshuber A, Bakkaloğlu A, Hildebrandt F. Patients with mutations in *NPHS2* (Podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2004;15: 722-732

11. Caridi G, Berteli R, Di Duca M, Dagnino M, Emma F, Muda AO, Scolari F, Miglietti N, Mazzucco G, Murer L, Carrea A, Massela L, Rizzoni G, Perfumo F, Ghiggeri M: Broadening the spectrum of disease related to podocin mutations. *J Am Soc Nephrol* 2003;14: 1278-1286

12. Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, Moriniere V, Tete MJ, Legendre C, Niaudet P, Antignac C. *NPHS2* mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int* 2004;66:571-579

13. Frishberg Y, Rinat C, Megged O, Shapira E, Feinstein S, Raas-Rothschild A. Mutations in *NPHS2* encoding podocin are a prevalent cause of steroid-resistant nephrotic syndrome among Israeli-Arab children. *J Am Soc Nephrol* 2002;13: 400-405

14. Maruyama K, Iijima K, Ikeda M, Kitamura A, Tsukaguchi H, Yoshiya K, Hoshii S, Wada N, Uemura O, Satomura K, Honda M, Yoshikawa N. *NPHS2* mutations in sporadic steroid- resistant nephrotic syndrome in Japanese children. *Pediatr Nephrol* 2003;18: 412-416

15. Niaudet P. Podocin and nephrotic syndrome: Implications for the clinician. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:832-834

16. Niaudet P. Steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome in children. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, eds. *Pediatric Nephrology*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams&Wilkins, 2004:557-573

17. McEnery PT, Strife CF. Nephrotic syndrome in childhood. Management and treatment in patients with minimal change disease, mesangial proliferation, or focal glomerulosclerosis. *Pediatr Clin North Am* 1982;29:875-894

18. Sharples PM, Poulton J, White RHR. Steroid responsive nephrotic syndrome is more common in Asians. *Arch Dis Child* 1985;60:1014-1017

19. Coovadia HM, Adhikari M, Morel-Maroger L. Clinicopathological features of the nephrotic syndrome in South African children. *QJM* 1979;48:77-91

20. Ingulli E, TejaniA. Racial differences in the incidence and renal outcome of idiopathic focal segmental glomerulosclerosis in children. *Pediatr Nephrol* 1991;5:393-397

21. Cameron JS, Turner DR, Ogg CS, Sharpstone P, Brown CB. The nephrotic syndrome in adults with minimal change glomerular lesions. *QJM* 1974;43:461-488

22. International Study of Kidney Disease in Children: The primary nephrotic syndrome in children. Identification of patients with minimal change nephrotic syndrome from initial response to prednisone. *J Pediatr* 1981;98:561-564

23. Churg J, Habib R, White RH. Pathology of the nephrotic syndrome in children. A report for the International Study of Kidney Disease in Children. *Lancet* 1970;760:1299-1302

24. White RH, Glasgow EF, Mills RJ. Clinicopathological study of nephrotic syndrome in childhood. *Lancet* 1970;i:1353-1359

25. Özkaya N, Çakar N, Ekim M, Kara N, Akkök N, Yalçınkaya F. Primary nephrotic syndrome during childhood in Turkey. *Pediatrics International* 2004;46:436-438

26. Koyama A, Fujisaki M, Kabayashi M, İgarashi M, Narita M. A glomerular permeability factor produced by human T cell hybridoma. Kidney Int 1991;40:453-460

27. Mathieson PW. Immune dysregulation in minimal change nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:26-29

28. Brenchley PE. Vascular permeability factors in steroid-sensitive nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18 (Suppl 6):21-5

29. Savin VJ, Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, Swan SK, Ellis E, Lovell H, Warady B, Gunwar S, Chonko AM, Artero M, Vincenti F. Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Eng J Med* 1996;334:878-883

30. Carraro M, Caridi G, Bruschı M, Artero M, Berteli R, Zennaro C, Musante L, Candiano G, Perfumo F, Ghiggeri GM. Serum glomerular permeability activity in patients with podocin mutations (*NPHS2*) and steroid –resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1946-1952

31. Jalanko H. Pathogenesis of proteinuria: lessons learned from nephrin and podocin *Pediatr Nephrol* 2003;18:487-491

32. Somlo S, Mundel P. Getting foothold in nephrotic syndrome. *Nature Genet* 2000;24:333- 335

33. Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:3005-3015

34. Oh J, Reiser J, Mundel P. Dynamic reorganization of the podocyte actin cytoskeleton in the nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2004;19:130-137

35. Akhtar M, Al Mana H. Molecular Basis of Proteinuria. *Adv Anat Pathol* 2004;11:304-309

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

37. Niaudet P. Genetic forms of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2004;19:1313-18

38. Zoysa JR, Topham PS. Podocyte biology in human disease. *Nephrology* 2005;10:362-367

39. Holmberg C, Tryggvason K, Kestila MK, Jalanko HJ. Congenital nephrotic syndrome. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, eds. *Pediatric Nephrology*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams&Wilkins, 2004:504-516

40. Schultheiss M, Ruf RG, Mucha BE, Wiggins R, Fuchshuber A, Lichtenberger A, Hildebrandt F. No evidence for genotype/phenotype correlation in *NPHS1* and *NPHS2* mutations. *Pediatr Nephrol* 2004;19:1340-1348

41. Tsukaguchi H, Sudhakar A, Le TC, Nguyen T, Yao J, Schwimmer JA, Schacter AD, Poch E, Abreu PF, Apel GB, Pereira AB, Kalluri R, Pollak MR. *NPHS2* mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest* 2002;110:1659-1666

42. Caridi G, Berteli R, Scolari F, Sana-Cherchi S, Di Duca M, Ghiggeri GM. Podocin mutations in sporadic focal-segmental glomerulosclerosis occuring in adulthood. *Kidney International* 2003;64:365

43. Koziell A, Grech V, Hussain S, Lee G, Lenkkeri U, Tryggvason K, Scombler P. Genotype/phenotype correlations of *NPHS1* and *NPHS2* mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration. *Hum Mol Genet* 2002;11: 379-388

44. Fuchshuber A, Grıbouval O, Ronner V, Kroiss S, Karle S, Brandis M, Hildebrandt F. Clinical and genetic evaluation of familial steroid responsive nephrotic syndrome in childhood. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:374-378

45. Mathis BJ, Kim SH, Calabrese K, Haas M, Seidman JG, Seidman CE, Pollak MR. A locus for inherited focal segmental glomerulosclerosis maps to chromosome 19q13. *Kidney International* 1998;53:282-286

46. Winn MP, Conlon PJ, LynnKL, Howell DN, Slotterbeck BD, Smith AH, Graham FL, Bembe M, Quarles LD, Pericak-Vance MA, Vance JM. Linkage of a gene causing familial focal focal segmental glomerulosclerosis to chromosome 11 and further evidence of genetic heterogeneity. *Genomics* 1999;58:113-120

47. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HO, Mathis BJ, Rodriguez –Perez JC, Allen PG, Beggs AH, Pollak MR. Mutations in *ACTN4*, encoding α-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000;24:251- 256

48. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB. A mutation in the *TRPC6* cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 2005;308:1801-1804

49. Walz G. Slit or pore ? A mutation of the ion channel *TRPC6* cuses FSGS. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1777-1779

50. Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, Grünfeld JP, Jaubert F, Kuttenn F, Fekete CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K. Donor

splice-site mutations in *WT1* are responsible for Frasier syndrome. *Nature genetics* 1997;17:467-470

51. Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Maniyel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal uregenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 1991;67:437-447

52. Jeanpierre C, Denamur E, Henry I, Cabanis O, Luce S, Cecille A, Elion J, Peuchmaur M, Loirat C, Niaudet P, Gubler MC, Junien C. Identification of constitutional *WT1* mutations in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database. *Am. J. Hum. Genet.* 1998;62:824-833

53. Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nuguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner JH, Shaw AS. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2 associated protein. *Science* 1999;286:312-315

54. Kim JM, Wu H, Green G, Winkler CA, Kopp JB, Miner JH, Unanue ER, Shaw AS. CD2 associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* 2003;300:1298-1300

55. Rana K, Isbel N, Buzza M, Dagher H, Henning P, Kainer G, Savige J. Clinical, histopathologic and genetic studies in nine families with focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 2003;41:1170-1178

56. Winn MP. Approach to the evaluation of heritable diseases and update on familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18 (suppl 6):14-20

57. Yu Z, Ding J, Huang J, Yao Y, Xiao H, Zhang J, Liu J, Yang J. Mutations in NPHS2 in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Chinese children. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 902-908

58. Ekim M, Özçakar ZB, Acar B, Yüksel S, Yalçınkaya F, Tulunay Ö, Ensari A, Erbay B. Three siblings with steroid-resistant nephrotic syndrome: New *NPHS2* mutations in a Turkish family. *Am J Kidney Dis* 2004;44: E22-24

59. Caridi G, Berdeli A, Dagnino M, Di Duca M, Mir S, Cura A, Ravazzolo R, Ghiggeri GM. Infantile steroid-resistant nephrotic syndrome associated with

double homozygous mutations of podocin. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 727-732

60. Özer EA, Aksu N, Erdoğan H, Yavaşcan Ö, Kara O, Gribouval O, Gubler MC, Antignac C. A novel *NPHS2* gene mutation in Turkish children with familial sterod-resistant nephrotic syndrome. *Nephrology* 2004;9:310-312

61. Winn MP. Not all in the family: Mutations of podocin in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:577-579

62. Chesney R. The changing face of childhood nephrotic syndrome. *Kidney International* 2004;66:1294-1302

63. Bertelli R, Ginevri F, Caridi G, Dagnino M, Sandrini S, Di Duca M, Emma F, Sana-Cherchi S, Scolari F, Neri TM, Murer L, Massella L, Basile G, Rizzoni G, Perfumo F, Ghiggeri GM. Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis after renal transplantation in patients with mutations of podocin. *Am J Kidney Dis* 2003;41: 1314-1321

64. Winn MP, Alkhunaizi AM, Bennett WM, Garber RL, Howell DN, Butterly DW, Conlon PJ. Focal segmental glomerulosclerosis: A need for caution in live related renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 1999;33:970-974

Ek-1

STEROİDE DİRENÇLİ NEFROTİK SENDROMLARDA GENETİK İNCELEME

Form doldurma tarihi: **Adres:**

Formu dolduran kişi: **Tel. No:**

Hastanın takip edildiği merkez: **Ağırlık :**

Adı-Soyadı: **m²:**

Dosya No:

Cinsiyet:

Yaş (DT):

Soygeçmiş: Anne-baba akrabalık:

Ailede benzer hastalık:

Yakınmaların başlama yaşı (Tarih):

Yakınmalar-bulgular: Karın ağrısı

Hipertansiyon

Tromboz

Enfeksiyon

Hematüri: Mikroskopik Makroskopik

Ödem: Lokalize: Periorbital Generalize

Pretibial

Skrotal-vulvar

Asit

Plevral effüzyon

Laboratuar: TİT: Proteinüri Hematüri

24 saatlik idrar proteini: miktarı: Kreatinin klirensi:

Total protein: Albumin: Üre: Kreatinin: Hb: Htc:

Trigliserid: Kolesterol: LDL: VLDL: HDL:

Böbrek biyopsi yaşı: **Biyopsi sonucu:** Işık mikroskopisi:

IF:

Tedavi: Steroid: Po Doz: Süre: Yanıt:

PMP

Siklofosfamid: Doz: Süre: Yanıt:

Klorambusil: Doz: Süre: Yanıt:

Siklosporin Doz: Süre: Yanıt:

Diğer:

KBY: Yok Prediyaliz Diyaliz Transplant

Proteinüri başladıktan sonraki izlem süresi:

Son dönem böbrek yetmezliği gelişme yaşı (tarih):

Steroid yan etkileri: Göz bulguları: Katarakt Glokom

Kemik bulguları: Aseptik femur başı nekrozu KMD'de azalma

Hiperglisemi

Obesite

Hipertansiyon

Diğer

MUTASYON: