

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALPORT SENDROMU İLE İLİŞKİLİ GENLERE AİT
VARYASYONLARIN YENİ NESİL DİZİLEME (YND) METODU İLE
İNCELENMESİ

Cüneyd YAVAŞ

DOKTORA TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Temmuz, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALPORT SENDROMU İLE İLİŞKİLİ GENLERE AİT
VARYASYONLARIN YENİ NESİL DİZİLEME (YND) METODU İLE
İNCELENMESİ**

Cüneyd YAVAŞ tarafından hazırlanan tez çalışması 01.07.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Cemal ÜN, Üye

Ege Üniversitesi

Doç. Dr. Emel ORDU, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Efe KÖSEOĞLU, Üye

Biruni Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Alport Sendromu İle İlişkili Genlere Ait Varyasyonların Yeni Nesil Dizileme (YND) Metodu İle İncelenmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Cüneyd YAVAŞ

İmza



*Biricik eřime
ve ocuklarım*

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her konuda destek ve ilgisini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden çokça faydalandığım danışman hocam Prof. Dr. Nehir Özdemir Özgentürk'e içtenlikle teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Doktora eş danışmanım ve tez komitesi üyeleri Prof. Dr. Cemal Ün, Dr. Öğr. Üyesi Emel Ordu, Prof. Dr. Semiha Erişen ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Efe KÖSEOĞLU hocalarıma tezimin olgunlaşmasından tamamlanana kadar tüm süreçteki görüş öneri, eleştiri ve değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca sürekli yardımlarını esirgemeyen Haseki Eğitim ve Araştırma hastanesi, Çam ve Sakura Şehir Hastanesi hekimlerine ve laboratuvar arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Cüneyd YAVAŞ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	15
1 GİRİŞ	17
1.1 Literatür Özeti	17
1.2 Tezin Amacı.....	18
1.3 Hipotez.....	18
2 GENEL BİLGİLER	20
2.1 Alport Sendromunun Genetik Etiyolojisi.....	20
2.2 Kollajen	23
2.3 AS'nin Klinik Bulguları	26
2.3.1 Böbrek	26
2.3.2 Göz	27
2.3.3 Kulak.....	29
2.3.4 Diğer Bulgular.....	30
2.4 Sendromun Populasyonlardaki Dağılımı.....	31
2.5 Tanı.....	31
2.6 Tedavi ve Takip	33
2.7 Yeni Nesil Dizileme (YND) (Next Generation Sequencing, NGS)	38
2.8 Thermo Fisher Scientific Ion Torrent PGM Sistemi	42
3 MATERYAL METOD	44
3.1 Materyal.....	44
3.2 Metod.....	44
3.2.1 DNA izolasyonu.....	45
3.2.2 İzole Edilmiş DNA'ların Ölçülmesi.....	46
3.2.3 Yeni Nesil Dizileme Aşamaları.....	46
3.2.4 Yeni Varyasyonların Konfirmasyonu (Sanger Dizileme)	66

4 SONUÇ VE ÖNERİLER	74
4.1 Sonuç	74
4.2 Öneriler.....	90
KAYNAKÇA	97
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	109



SİMGE LİSTESİ

%	Yüzde
α	Alfa heliks yapı
A°	Amstrong



KISALTMA LİSTESİ

ABDRVS	Amerika Birleşik Devletleri Renal Veri Sistemi
ADAS	Otozomal Dominant Kalıtım
ARAS	Otozomal Resesif Kalıtım
AS	Alport Sendromu
BAM	Binary Alignment Map
BMB	Bazal membran bölgesi
bp	Baz çifti
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DMSO	Dimetil sülfoksit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FSGS	Fokal segmental glomerülosklerozun
GBM	Glomerüler bazal membran
GFR	Glomerül filtrasyon oranı
GMB	Glomerüler bazal membran
HiDi	Highly deionized Formamide
HPLC	Yüksek performanslı likit kromatografi
ID	Kimlik numarası
ISP	Ion Sphere Particles
iPSC	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
kb	Kilobaz
Low TE	Tris EDTA
M	Molar
NC1	Non kollajen
ORF	Open read frame (Açık okuma çerçevesi)
OT2	One Touch 2
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAAS	Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi

rpM	Dakikada tam bir dönüş miktarı
SDBY	Son Dönem Böbrek Yetmezliği
SNV	Tek nükleotid değişimi
SRNS	Steroid-dirençli nefrotik sendrom
TE	Tris EDTA
VCF	Variant Call Format
WES	Whole Ekzom Sequencing (Tüm Ekzom Dizileme)
WGS	Whole Genom Sequencing (Tüm Genom Dizileme)
XLAS	X Kromozomuna Bağlı Kalıtım
YND	Yeni Nesil Dizileme



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1	Kollajen yapıdan olmuş fibrillerin oluşum şekli (Nijhuis et al., 2019)	24
Şekil 2. 2	Kollajen lifleri oluşturan proteinlerin patojenik varyasyonu sonrasında ifade edilmesi (Kalluri, 2003).	25
Şekil 2. 3	AS hastalarında tipik oküler bozukluklar. a)benek retinopatisi b)kornea distrofisi (Savige et al., 2015; Zhang & Ding, 2018).	28
Şekil 2. 4	AS takipli hastalara tanı koyulması için gereken tanı basamakları	32
Şekil 2. 5	AS'de klinik görünüm ve tedavinin potansiyel etkisi. Üst: Hastalığın evresine göre tedavinin potansiyel etkisi. Şiddet arttıkça potansiyel etki sağa doğru azalır. Orta: AS'de bulunabilecek klinik özellikler. Klinik özellikler, sağa doğru daha fazla hastalık şiddeti anlamına gelir. Daha düşük: daha güçlü gölge, kalıtım modeline göre hastalığın daha sık ortaya çıkışını temsil eder (Torra & Furlano, 2019).	34
Şekil 2. 6	DNA dizileme teknolojilerinin çeşitleri (Dlamini et al., 2020).	40
Şekil 2. 7	Ion torrent platformunun hidrojen iyonu temelli çalışma prensibi (Mardis, 2013).	43
Şekil 3. 1	One Touch (OT2) cihazının görünümü	51
Şekil 3. 2	Emülsiyon PZR yapıldıktan sonra ürünlerin toplandığı tüpler	52
Şekil 3. 3	OT2 cihazının kritik parçaları	53
Şekil 3. 4	OT2 cihazının emülsiyon PZR'de yağ taşıma üniteleri	53
Şekil 3. 5	OT2 cihazının ürün taşıma iğnesi	54
Şekil 3. 6	Emülsiyon PZR için kütüphane ve yağ moleküllerinin birleştirildiği port	54
Şekil 3. 7	Porta örnek ve yağ yükleme aşaması	55
Şekil 3. 8	Porta eklenen yağ ve örneklerin ters-düz edilmesi	55
Şekil 3. 9	OT2 cihazının arayüz programından bir görüntü	56
Şekil 3. 10	Emülsiyon PZR sonrası ürünlerin toplanması	56
Şekil 3. 11	Zenginleştirme kuyucuklarının şeması	57
Şekil 3. 12	Zenginleştirme cihazının kuyucukları	58
Şekil 3. 13	Ion GeneStudio S5 Plus cihazının görünümü	58
Şekil 3. 14	S5 Plus cihazında kullanılan çipler	59
Şekil 3. 15	Örneklerin cihazda okutulması için çipe yüklenmesi	59
Şekil 3. 16	Analiz programının arayüzü	60
Şekil 3. 17	Analiz edilmiş varyasyonların kullanıcıya değerlendirmesi için sunulması	61

Şekil 3. 18 Bir varyasyon açısından veri tabanı bilgileri	65
Şekil 3. 19 3 farklı varyasyon tipinin IGV görüntüsü.....	66
Şekil 3. 20 Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer cihazının iç ve dış görünümü.....	71
Şekil 3. 21 SeqScape programının arayüzü.....	72
Şekil 3. 22 SeqScape programından indel varyasyon görüntüsü	73
Şekil 3. 23 SeqScape programından sırası ile a) heterozigot ve b) homozigot varyasyon görüntüsü.....	73



TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1 Alport Sendromunu moleküler genetik yönünden tespit etme yöntemleri	23
Tablo 3. 1 Her bir örnek için kullanılan PZR solüsyonları	46
Tablo 3. 2 Hedef bölgenin çoğaltılması için kullanılan termal program	47
Tablo 3. 3 Primer dizilerinin kesimi ve temizlenmesi için kullanılan termal program.....	47
Tablo 3. 4 Örnek barkod adaptör karışımı	48
Tablo 3. 5 Barkod-adaptör ligasyon karışımı.....	48
Tablo 3. 6 Ligasyon için kullanılan termal program	48
Tablo 3. 7 Kütüphane ürünlerinin PZR uygulamasında kullanılan reaktifler	49
Tablo 3. 8 PZR uygulamasında kullanılan termal program	50
Tablo 3. 9 Emülsiyon PZR bileşenleri.....	51
Tablo 3. 10 Kütüphane ürünlerini zenginleştirme reaktifleri.....	57
Tablo 3. 11 Analiz edilen varyasyonların ACMG kriterlerine göre patojenite skalası.....	62
Tablo 3. 12 <i>COL4A3</i> , <i>COL4A4</i> ve <i>COL4A5</i> genlerine ait primer dizileri	67
Tablo 3. 13 Sanger dizileme için kullanılan reaktifler	67
Tablo 3. 14 PZR için kullanılan termal program	68
Tablo 3. 15 Enzimatik saflaştırma için kullanılan termal program	69
Tablo 3. 16 Dizileme için kullanılan reaktifler	69
Tablo 3. 17 Dizileme için kullanılan termal program	70
Tablo 4. 1 Hastaların <i>COL4A3</i> (NM_000091.5) geninde tespit edilen varyasyonlar	76
Tablo 4. 2 Hastaların <i>COL4A4</i> (NM_000092.5) geninde tespit edilen varyasyonlar	78
Tablo 4. 3 Hastaların <i>COL4A5</i> (NM_033380.2) geninde tespit edilen varyasyonlar	80
Tablo 4. 4 Çalışmaya alınan hastaların klinik bulguları ve tespit edilen patojenik/muhtemel patojenik ve VUS varyasyonlar.....	83

Alport Sendromu İle İlişkili Genlere Ait Varyasyonların Yeni Nesil Dizileme (YND) Metodu İle İncelenmesi

Cüneyd YAVAŞ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Alport sendromu (AS), kalıtsal bir nefrit olup, sensörinöral işitme kaybı ve ilerleyen vakalarda bazen gözlenen farklı göz değişiklikleri ile karakterize bir sendromdur. İlk olarak 1900'lerin başında rapor edilmiştir. Böbrek hastalıklarının incelenmesi ve değerlendirilmesi açısından göz önünde bulundurulmuş ve üzerinde çokça araştırma yapılmış bir sendromdur. Genel olarak, bu sendromun teşhisi klinik belirtilere ve aile üyelerinin dikkatli muayenesine ve bazal membran yapısının elektron mikroskopik değerlendirmesine dayanır. Hastalık esas olarak X'e bağlı baskındır. Ancak hastalığın otozomal resesif AS ve otozomal dominant AS vakaların sırasıyla yaklaşık %15 ve %20'sini oluşturur. Hastalığın genel popülasyondaki prevalansı net olmamakla birlikte 1/10000-50000 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Alport sendromu, bazal membranın temel bileşenlerinden biri olan tip IV kollajenin $\alpha 3$, $\alpha 4$ ve $\alpha 5$ zincirlerini kodlayan *COL4A3*, *COL4A4* ve *COL4A5* genlerindeki patojenik varyasyonlardan kaynaklanır.

Türkiye'nin farklı yerlerinde yaşayan AS şüphesi ile genetik kliniğine başvurmuş 125 hastanın erişkin ve pediatrik hastayı kapsayan bu çalışmada hastaların klinik

bulguları ve genetik sonuçları incelenmiştir. Hastaların ilk değerlendirmedeki ortalama yaşları 23.05 ± 20 yıl (3-63 yaş) olarak hesaplanmıştır. Çalışmada yer alan hastaların 61'i (%48,8) kadın, 64'ü (%51,2) erkek olup kadın/erkek oranı 0,95'dir. Hastalarda en sık bulgu hematüriydi ve bunu ikinci olarak proteinüri izlemiştir. 18 hastada işitme kaybı tespit edildi. 45 hastada ise böbrek hastalıkları olduğu gözlemlendi. Fakat hastaların hepsinde klinik ile ilişkili olduğu düşünülen bir varyasyona rastlanmamıştır. 27 hastanın kliniğini açıklayabilecek tek gen ya da digenik patojenik/muhtemel patojenik varyasyona rastlandı. 16 hastada ise klinik önemi belirsiz (VUS) varyasyon tespit edilmiştir. Varyasyon tespit edilemeyen 82 hastanın AS ile benzer diğer sendrom ya da hastalıklar açısından değerlendirilmesi önerilmiştir. Bazı genetik hastalık grupları AS benzeri klinik göstermektedir. AS ile ilişkili genlerde klinik olarak ilişkili varyasyonlara sahip olmayan bu 85 hasta, Epstein sendromu, Fechtner sendromu, May-Hegglin anomalisi, Fabry hastalığı, Alport benzeri glomerülonefrit, *MYH9* gen varyasyonları ve Sebastian sendromlarına benzer kliniklere sahip olduğundan, bu hastalıklarla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Bu hastaların muhtemel diğer hastalıklar için daha fazla inceleme ile yeniden değerlendirilmesi gerekir.

Bu çalışmamız 125 hastanın yeni nesil dizileme analizi sonucunda; 50 missense, 8 delesyon/duplikasyon, 17 splice bölge mutasyonu (+-20 baz), 3 3'UTR ve 25 sinonim (sessiz) varyasyonu olmak üzere toplam 103 varyasyon tespit edilmiştir. Bu varyasyonların 21'ü patojenik/muhtemel patojenik, 17'si VUS, 63'ü benign/muhtemel benign kriterlerinde saptanmıştır. Bu 103 varyasyondan 33 tanesinin yeni varyasyon olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Alport sendromu, yeni nesil dizilme, *COL4A3*, *COL4A4* ve *COL4A5* varyasyonları.

Investigation Of Genes Variations Associated With Alport Syndrome Via The Next Generation Sequencing (NGS) Method

Cuneyd YAVAS

Department of Molecular Biology and Genetics

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Nehir OZDEMIR OZGENTURK

Alport syndrome (AS) is a hereditary nephritis, characterized by sensorineural hearing loss and different eye changes sometimes observed in progressive cases. It was first reported in the early 1900s. It is a syndrome that is considered in terms of the examination and evaluation of kidney diseases, and it is a syndrome that has been extensively researched and published. In general, the diagnosis of this syndrome is based on clinical signs and careful examination of family members and electron microscopic evaluation of basement membrane structure. The disease is mainly X-linked dominant. However, autosomal recessive AS and autosomal dominant AS constitute approximately 15% and 20% of the cases, respectively. Although the prevalence of the disease in the general population is not clear, it is estimated to be around 1/10000-50000. Alport syndrome is caused by pathogenic variations in the *COL4A3*, *COL4A4* and *COL4A5* genes encoding the $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$ chains of type IV collagen, one of the main components of the basement membrane.

In this study, which included 125 adult and pediatric patients who were born in different parts of Turkey and applied to the genetic clinic with the suspicion of AS,

the clinical findings and genetic results of the patients were analyzed. The mean age of the patients at the first evaluation was calculated as 23.05 ± 20 years (3-63 years). Of the patients included in the study, 61 (48.8%) were female and 64 (51.2%) were male, with a female/male ratio of 0.95. The most common finding in patients was hematuria, followed by proteinuria. Hearing loss was detected in 18 patients. Renal diseases were observed in 45 patients. However, no variation thought to be clinically relevant was found in all patients. A single gene or digenic variation was found that could explain the clinic of 27 patients. In 16 patients, variation of uncertain clinical significance (VUS) was detected. It was recommended that 82 patients with no variation be evaluated for other syndromes or diseases similar to AS. It was recommended to evaluate 82 patients whose variation could not be detected in terms of other syndromes or diseases similar to AS. Some genetic disease groups show AS-like clinic. These 85 patients without clinically related variations in AS-related genes are estimated to be associated with these diseases, as they have clinics similar to Epstein syndrome, Fechtner syndrome, May-Hegglin anomaly, Fabry disease, Alport-like glomerulonephritis, *MYH9* gene variations, and Sebastian syndromes. These patients are needed to be re-evaluated with further examination for other possible diseases.

As a result of the new generation sequencing analysis of 125 patients in this study; A total of 103 variations were detected, including 50 missense, 8 deletion/duplication, 17 splice region mutations (+-20 base), 3 3'UTR and 25 synonymous variations. 21 of these variations were pathogenic/likely pathogenic, 17 were of VUS, and 63 were found to be benign /likely benign. 33 of these 103 variations were determined as novel variations.

Keywords: Alport syndrome, next generation sequence, *COL4A3*, *COL4A4* and *COL4A5* variants.

1.1 Literatür Özeti

Alport sendromu (AS), kollajen ifade eden *COL4A3*, *COL4A4* ve *COL4A5* genlerinde ortaya çıkan patojenik varyasyonlar sonucu proteinin bozulması ile kalıtsal, ilerleyici böbrek hastalığından ilerleyici olmayan veya çok yavaş ilerleyen bir seyir ile izole hematüriye kadar değişen bir fenotip spektrumu gözlenmektedir (Nozu et al., 2019). Hastalarda böbrek kliniği dışında oküler ve işitme ile ilgili problemler de görülebilmektedir. AS'nin yaklaşık %55'i (XLAS), %15'i otozomal resesif (ARAS) ve yaklaşık %20'si otozomal dominanttır (ADAS) ve çok az sayıda digenik olarak bildirilmiştir (Kruegel et al., 2013).

X'e bağlı AS'li erkek hastalarda, Alport sendromunun genotipi ve fenotipi arasındaki ilişki iyi tanımlanmıştır ve mutasyon tipine bağlı olarak son dönem böbrek yetmezliği riskini geliştirmede önemli olduğu gösterilmiştir. Hastalar tedavi edilmezse, böbrek hastalığı, mikroskobik hematüriden (mikrohematüri) proteinüriye, ilerleyici böbrek yetmezliğine kadar ilerleme gösterebilmektedir (Savige et al., 2019).

AS ilk olarak bir İngiliz ailede, bir doktor olan Cecil A. Alport tarafından tanımlanmıştır. Bu yüzden bu sendrom Alport olarak literatüre geçmiştir (Alport, 1927). Fakat bu isimlendirme öncesinde Leonhard G. Guthrie, 1902 yılında bir ailede tekrarlayan hematüri atakları olduğunu ve sadece anne tarafından aktarıldığını raporlanmıştır. Rapor ettiği yıllarda kronik böbrek hasarlı bir aile üyesi olmadığı da bildirilmiştir. On yıl sonra, 1912'de George Kendal ve Arthur F. Hertz ve Arthur F. Hurst 1923'te aynı aileyi takip etmeye devam etmişler ve hastalığı "kalıtsal ailesel konjenital hemorajik nefrit" olarak adlandırmışlardır. Hurst tarafından belirtilen aile ağacına göre, etkilenen hastalardan 3'ünde işitme kaybı olmasına rağmen, makalede bundan hastalığın bir parçası olarak bahsedilmemiştir. 1927'de A. Cecil Alport aynı aileyi yeniden değerlendirmiş, birçok aile üyesinin böbrek hastalığı ve işitme kaybı yaşadığını bildirmiştir.

Etkilenen erkekler üremiden ölürken, etkilenen kadınlar ise yaşlılık evresine kadar yaşamıştır (Alport, 1927).

Ülkemiz ve yakın coğrafi bölgemizde akraba evliliği yaygındır. Çoğu evlilikler birinci dereceden kuzen evlilikleri olup genellikle kardeş çocukları arasında görülmektedir (Kaplan et al., 2016). Otozomal resesif hastalıklar, akraba evliliklerinde genetik hastalıkların yeni nesillere aktarılmasında önemli rol oynamaktadır. Genellikle genetik hastalıkların resesif formları dominant formuna göre şiddetli klinik tablo ile seyretmektedir (Barozzi et al., 2020). Bu nedenlerden dolayı ülkemizde ARAS çalışmaları önem kazanmaktadır. Ülkemizde AS ile ilgili çalışmalar çok az olup bazı yönlerden kısıtlılıkları mevcuttur.

1.2 Tezin Amacı

Erken tedavi ile son dönem böbrek yetmezliğinin (SDBY) ilerlemesini yavaşlatmada hastaların erken teşhisi çok önemlidir. AS'nin ilk belirtisi yalnızca kalıcı mikroskobik hematüridir ve bu, genellikle hastanın tanı yaşını geciktiren bir gerçektir. Bu nedenle hematürisi olan hastalarda ailede böbrek hastalığı öyküsü varsa AS'ye ve moleküler genetik çalışmalara öncelik verilmelidir. Bu çalışmada, AS şüphesi olan hastaların klinik semptomları ve moleküler özellikleri tanımlanarak genotip-fenotip korelasyonunun ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Bir varyasyonun hastalığa sebep olduğunu anlamak için bazı kriterler mevcuttur. Bu kriterlerden biri de *in silico* analizler ile varyasyonun amino asit ikamelerindeki önemi hesaplayarak, protein katlanmasındaki rolünü ve protein işlevindeki bozulmaları belirlemede yardımcı olmaktadır. Domain bölgelerde olan varyasyonlar patojeniteyi arttırmaktadır. Fakat bazı varyasyonlar domain bölgelerde bulunmasına karşın hasta olmayan bireylerde de gözlemlenmek mümkündür.

Hastalarda tespit edilen yeni varyasyonlar (novel varyasyon) aracılığıyla AS'nin moleküler değişkenliğini incelenmesi amaçlanan bu çalışmada ayrıca ileride genetik olarak tedavinin mümkün olacağı durumlarda varyasyon tipinin belirlenmesinin öneminin artacağı düşünülmektedir. Yeni varyasyonların

tespitinin erken teşhis ve tedavi için önemli bir hale geleceği düşünölmektedir. Ayrıca kontrol gruplarının çalışmaya katılarak tespit edilen varyasyonların sağlıklı bireylerde ne kadar etkili olduğuna dair fikir edinilmesi açısından önem arz etmektedir.



2.1 Alport Sendromunun Genetik Etiyolojisi

Tip IV kollajen proteini altı farklı α zincirini ihtiva etmektedir. Bu zincirler C-terminal bölgelerinin etkileşimleri ile $\alpha 1-1-2$, $\alpha 3-4-5$ ve $\alpha 5-5-6$ olmak üzere üç tane üçlü sarmal oluştururlar. Bu yapılar, C-terminali ve N-terminal etkileşimleri ile uçtan uca bağlantılarla kollajen ağları oluştururlar (Kashtan, 2021). Bu sarmal proteinlerini ifade eden altı gen; *COL4A1* ve *COL4A2* 13. kromozom üzerinde (13q34) , *COL4A3* ve *COL4A4* 2. kromozom üzerinde (2q35-37), *COL4A5* ve *COL4A6* X kromozom üzerinde (Xq22.3) lokalize olmuşlardır. Patojenik varyasyonların tip IV kolajen sentezini ve tip IV kolajen ağının oluşumunu etkilediği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda *COL4A3*, *COL4A4* ve *COL4A5* genlerinin patojenik varyasyonların AS kliniğinden sorumlu oldukları bildirilmiştir (Kashtan, 2004).

Wieslander ve arkadaşları Goodpasture antikorlarının tip IV kollajen molekülünün kollajenaz dirençli kısımlarıyla reaksiyona girdiğine dair immünokimyasal kanıtlar sunmuştur. Glomerülonefrit vakalarının yaklaşık %5'ine glomerüler bazal membrana (GBM) yönelik otoantikorlar aracılık etmektedir. Hastaların çoğu Goodpasture sendromu (glomerülonefrit ve pulmoner kanama) ile başvurmaktadır (Wieslander et al., 1985). *COL4A3* genini Hellmark ve arkadaşları ilk kez, bir insan otoimmün hastalığında patojenik otoantikorlar tarafından tanınan tek bir immünodominant konformasyonel epitopun moleküler karakterizasyonunu sağlamıştır. Goodpasture hastalığında tanımlanmış bu bozukluğun tedavisinde yeni epitopa özgü yaklaşımlarının geliştirilmesinin temelini temsil etmektedir. Hellmark ve arkadaşları epitopu, *COL4A3* zincirinin tekli rezidülerini reaktif olmayan *COL4A1* geninden karşılık gelen amino asitlerle değiştirerek tanımlamıştır. *COL4A3* geninde Goodpasture epitopunu tamamen ortadan kaldıran değiştirme mutasyonları tanımlanmıştır. *COL4A1* kollajen olmayan alanındaki 9 kesintili pozisyonun *COL4A3* zincirinden amino asit

rezidüleri ile ikame edilmesi, tüm hasta serumları tarafından tanınan ancak sağlıklı kontrollerden hiçbir serum tarafından tanınmayan rekombinant yapı ile sonuçlanmıştır (Hellmark et al., 1999). Otozomal resesif AS gösteren 2 ailede Mochizuki ve arkadaşları ilk olarak *COL4A3* geninde homozigot mutasyonların varlığını göstermiştir (Mochizuki et al., 1994).

Momota ve arkadaşları *COL4A4* genini ilk defa tanımlamışlardır. Bu genin ekzon 1 ve 1-asal olarak adlandırılan alternatif kodlamayan birinci ekzonları içerdiğini belirlemişlerdir. Ekzon 2 protein ifadesinin başladığı bölge olarak tespit edilmiş olup *COL4A3* ve *COL4A4* genleri, kromozom 2'nin karşıt dizileri üzerindedir ve zıt yönlerde kopyalanmaktadır. *COL4A3*'ün ilk ekzonu, *COL4A4*'ün ekzon 1 ve 1-asallarından sırasıyla 372 ve 5 bp olarak ayrılmaktadır. Her iki gen tarafından paylaşılan promotör bölge, yoğun CpG dinükleotidleri, GC kutuları, CTC kutuları ve bir CCAAT kutusundan oluşur, ancak bir TATA kutusundan bulunmamaktadır (Momota et al., 1998). Otozomal resesif AS olduğu düşünülen 7 ailede Mochizuki ve arkadaşları 2 ailede *COL4A4* geninde ve diğer 2 ailede de *COL4A3* mutasyonlarının klinikle ilişkili olarak varlığı göstermiştir (Mochizuki et al., 1994).

Zhou ve arkadaşları intron-ekzon yapısı dahil olmak üzere insan *COL4A5* genini ilk olarak tanımlamışlardır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile genomik DNA'dan amplifikasyondan sonra dizilenen ekzon 15 hariç olmak üzere, genomik faj klonlarından 19 ekzonun dizisi belirlenmiştir. Genin ekzon boyutlarının, alfa-1(IV) zincirinde gözlenenlerle dikkate değer bir benzerlik taşıdığı belirtilmiştir (Zhou et al., 1991). Lemmink ve arkadaşları tip IV kollajen genlerindeki mutasyonlarla ilişkili klinik belirtilerin kapsamlı bir incelemesini yapmışlardır. Hastalarda şiddetli klinik ve genetik olarak heterojen böbrek bozukluğu olan Alport sendromundan otozomal dominant ailesel iyi huylu hematüriye kadar değişmektedir. Araştırmacılar *COL4A5* geninde 160'tan fazla farklı mutasyonun tanımlandığını belirtmişlerdir. Otozomal resesif AS'na *COL4A3* ve *COL4A4* genlerindeki mutasyonların neden olduğu bildirilmiştir. Daha önce bildirilen *COL4A5* mutasyonlarına Lemmink ve arkadaşları, XLAS olan hasta gruplarında tespit edilen 8 mutasyonu tespit etmiştir. Mutasyonların spektrumu geniş olduğu

ve AS'nun böbrek yetmezliği yaşı ve eşlik eden özelliklere göre klinik değişkenliği hakkında fikir verdiği bildirilmiştir (Lemmink et al., 1997).

AS için dört kalıtım şekli tanımlanmıştır. Bunlar; X'e bağlı, otozomal çekinik, otozomal dominant ve digenik kalıtlıdır. AS'nin moleküler genetik açıdan tespit yöntemleri ve dağılımı tablo 2.1'de gösterilmiştir. Mendel kalıtımının esaslarına göre;

COL4A5 tip IV $\alpha 5$ zincirini ifade eden X kromozomunda lokalize gendir (Xq22.3). Vakaların çoğunluğunda bu gendeki patojenik varyasyonlar sorumludur. *COL4A5* geni 250 kb büyüklüğünde, 51 ekzona sahip ve 1685 aminoasitten oluşan bir protein ifade etmektedir. Bu gende bu zamana kadar 300'den fazla varyasyon tespit edilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). XLAS olan ailelerin *COL4A5* patojenik varyantı için heterozigot olan annelerin her hamilelikte patojenik varyantı aktarma şansı %50'dir. Patojenik kalıtım aktarılan erkekler AS'dan etkilenecek, sonunda SDBY ve çoğu durumda sağırılık geliştirecektir. Patojenik varyantı kalıtsal olarak alan kadınlarda ise tipik olarak asemptomatik hematüri olur, ancak daha şiddetli böbrek hastalığı olabilir. Etkilenen erkekler yeni nesillere patojenik varyantı aktardığında tüm kadınlar etkilenecek fakat erkekler etkilenmeyecektir (Basta-Jovanovic et al., 1990).

COL4A3 ve *COL4A4* sırası ile tip IV $\alpha 3-4$ ifade eden genlerdir ve 2. kromozom üzerinde lokalize olmuşlardır (2q35-q37). *COL4A3* geni 150 kb büyüklüğünde, 52 ekzona sahip ve 1670 aminoasitten oluşan bir protein ifade etmektedir. *COL4A4* geni 194 kb büyüklüğünde 48 ekzona sahip ve 1690 aminoasitten oluşan protein ifade eder. Bu genlerdeki patojenik varyasyonlar ARAS ya da ADAS kalıtım göstermektedir. ARAS ailelerde etkilenen bir çocuğun ebeveynleri zorunlu heterozigotlardır ve anne baba alellerinde patojenik ya da patojenik olduğu düşünülen varyasyon taşıyıcılarıdır. Resesif taşıyıcılık olmasından dolayı her kardeşin etkilenme olasılığı %25, semptomatik olan veya olmayan taşıyıcı olma olasılığı %50 ve sağlıklı olma olasılığı %25'tir (Hertz et al., 2015).

ADAS heterozigot patojenik varyasyonları XLAS klinik özelliklerine benzemektedir fakat böbrek bulguları daha zayıf ilerleyebilmektedir. Ailelerde etkilenen bireyin

her çocuğunun patojenik varyantı kalıtım yoluyla alma ve etkilenme olasılığı %50'dir (Kashtan, 2021; Malone et al., 2014).

Ayrıca birkaç ailede AS'da digenik kalıtım tanımlanmış olup alelik varyasyonlar cis veya trans olabilmekte ve AS kliniğine benzer özellikler gösterirler. Digenik kalıtımı olan nadir Alport ailelerinde (*COL4A3*, *COL4A4* ve *COL4A5* genlerinin iki veya daha fazlasındaki patojenik varyasyonlar), kalıtım paternleri mendel kalıtımına uymayabilmektedir (Gast et al., 2016; Kashtan, 2021).

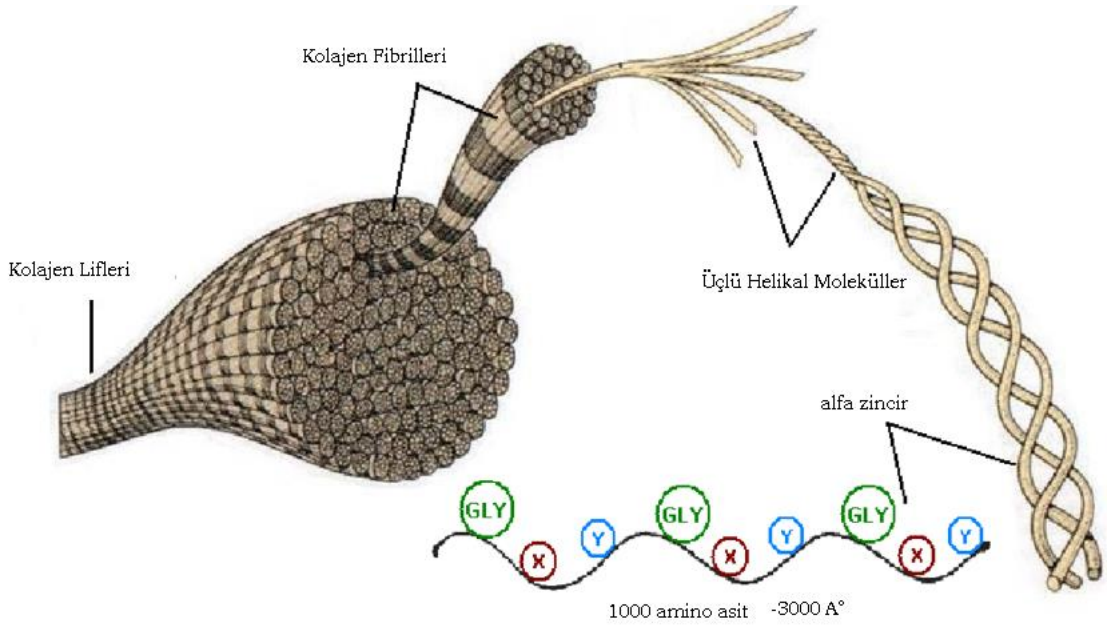
Tablo 2. 1 Alport Sendromunu moleküler genetik yönünden tespit etme yöntemleri

Gen	Patojenik Varyasyonların Dağılımı		Varyasyonların Tespit Edilme Metodları	
		Kalıtım	Dizileme	Delesyon Duplikasyon
<i>COL4A3</i>	%12-15	ARAS ~%45	~%98	~%2
		ADAS ~%55		
<i>COL4A4</i>	%5-8	ARAS ~%45 ADAS %55	~%98	~%2
<i>COLA5</i>	%80-85	XLAS %100	~%85-90	%10-15









2.2 Kollajen

Kollajenler, hücre dışı matris, tendonlar, kıkırdak, organik kemik matrisi ve kornea gibi bağ dokularında bulunan ana lifli glikoproteinlerdir ve bu dokuların

dayanıklılıklarına katkıda bulunmaktadır. Kollajen hayvanlar aleminde çok yaygın olup memeli canlıların vücut ağırlığının %6'sını ve toplam vücut proteininin %30'unu temsil etmektedir. Kollajen molekülünün en ayırt edici özelliği, üç birim alt polipeptitten oluşan üçlü sarmaldır. Alt polipeptit birimi olan zincir, ortak bir eksen etrafında dönerek 3000 Å uzunluğunda ve 15 Å çapında katı çubuk şeklinde bir filament molekülü oluştururlar (Kalluri, 2003).



Şekil 2. 1 Kollajen yapıdan olmuş fibrillerin oluşum şekli (Nijhuis et al., 2019)

TİP IV KOLAJEN ÜÇLÜ HELİX YAPISI	MOLEKÜLER MUTASYON	FENOTİP
	YOK	NORMAL GBM
	1 COL4A5 MUTASYONU X=Y	XLAS ETKİLENMİŞ ERKEK SDBY
	1 COL4A5 MUTASYONU X=X	XLAS TAŞIYICI KADIN DEĞİŞKEN SONUÇLU
	2 COL4A3 MUTASYONU	ARAS ETKİLENMİŞ SDBY
	2 COL4A4 MUTASYONU	
	1 COL4A3 MUTASYONU	DEĞİŞKEN SONUÇLU
	1 COL4A4 MUTASYONU	
	1 COL4A3 MUTASYONU 1 COL4A4 MUTASYONU	

Şekil 2. 2 Kollajen lifleri oluşturan proteinlerin patojenik varyasyonu sonrasında ifade edilmesi (Kalluri, 2003).

Memelilerdeki tüm tip IV kollajen, genetik olarak farklı altı α -zincir polipeptidinden ($\alpha 1$ – $\alpha 6$) sentezlenmektedir. Tip IV kollajen α zincirleri, amino asit seviyesinde %50 – 70 homoloji gösteren benzer yapıya sahiptirler. α -zincirleri üç alana ayrılabilir; bir amino-terminal 7S alanı, bir orta üçlü sarmal alan ve bir karboksi-terminal kollajen olmayan (NC)-1 alanıdır. Üçlü sarmal alanı, klasik kollajen Gly-XY dizi motifi içinde yaklaşık 22 rezidü kesinti olmaksızın 1.400 amino asit (aa) uzunluğunda en uzun protein dizisini ihtiva etmektedir. Her zincirin yaklaşık olarak 230 amino asit uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir. Tüm kollajen yapılarında olduğu gibi NC1 alanı kollajenlerin trimer oluşumları için önem arz etmektedir. Tip IV kollajen molekülleri, karmaşık protein ağları oluşturmak için birbirine bağlanmaktadır. Bu ağlar, birçok hücredeki hücreleri ayıran ve destekleyen ince, tabaka benzeri yapılar olan bazal membran bölgelerinin (BMB) büyük bir bölümünü oluşturmaktadırlar. Tip IV kollajen, 3-4-5 ağları ile böbrek, iç kulak ve gözün BMZ'sinde önemli bir rol oynamaktadır. $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ ağlarından

oluşan Tip IV kollajen, 3 organdaki dokuların bazal membran ana iskeletlerini oluşturan makromolekülleridir (Yurchenco, 2011).

2.3 AS'nin Klinik Bulguları

AS'nin diğer kalıtsal böbrek hastalıklardan ayıran en önemli özelliği X' bağlı kalıtsal olmasıdır. Fakat somatik genlerde olan varyasyonlarda hastalığa sebebiyet vermektedir. En çok görülen klinikler arasında böbrek hastalıklarına ilerleyen glomüler hastalıklar, işitme kayıpları ve görme bozuklukları (oküler bozukluklar) yer almaktadır. Ayrıca çok az olmakla birlikte hastalarda leiomyomlar ve anevrizmalar (torasik, abdominal ve intracranial) olarak da bildirilmiştir (Kashtan et al., 2018).

2.3.1 Böbrek

Hematüri, proteinüri ve albuminüri bulguları böbrek fonksiyonlarının incelenmesinde önemli rol oynar. AS'nin diğer kalıtsal böbrek hastalıklarından ayırt edici özelliklerinden biri de mikroskopik hematüridir. *COL4* genlerindeki patojenik varyantlar, proteinüri ve FSGS renal biyopsi bulguları olan erişkin hastalarda genellikle görülen kliniklerdir (Nozu et al., 2019). Bazı hastalarda hipertansiyon ve proteinüri klinik olarak geç başlangıçlı olarak bildirilmiştir (Kashtan & Gross, 2021). Yaş ilerledikçe hastalarda tansiyonun etkisi de artmaktadır. Böbrek yetmezlikleri varyasyonun tipine göre değişmektedir. Erken dönem böbrek yetmezliklerinde genellikle yıkıcı etkilere sahip varyasyonlar (stop kodon, çerçeve kayması delesyon ve insersiyonlar) bulunurken, diğer etkili varyasyonlar ise son dönemde böbrek yetmezliklerine neden olmaktadır (Jais et al., 2000). Yapılan bir çalışmada büyük delesyon, nonsense veya frameshift varyasyonlarda 30 yaşından önce SDBY gelişim oranı %90 iken, bu oran "splice-site" varyasyonlarda %70, missense varyasyonlarda %50 olarak bildirilmiştir (Bekheirnia et al., 2010).

XLAS'lı tüm erkeklerde ve ARAS'lı tüm erkek ve kadınlarda hastalık SDBY'ne kadar ilerlemektedir. İlerleyen yaşla birlikte proteinüri, hipertansiyon gelişir ayrıca etkilenen erkeklerin %100'ünde ve etkilenen kadınların %90'ından fazlasında mikrohematüri vardır. Tüm erkeklerde proteinüri ve nihayetinde SDBY'ne yol açan ilerleyici böbrek yetmezliği gelişir. Tahminen hastaların %60'ı 30 yaşından

ve %90'ı 40 yaşından sonra SDBY kliniği gözlenir. SDBY'nin ilerleme hızı *COL4A5* patojenik varyantın çeşidine göre değişmektedir. XLAS'lı erkeklerde erken yaşlardan itibaren kalıcı mikrohematüri vardır (Jais et al., 2003).

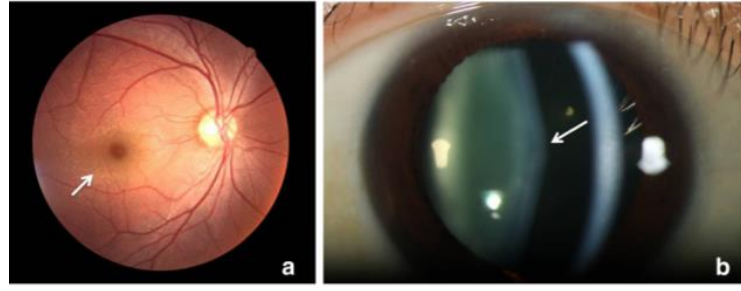
ADAS'lı bireylerde, SDBY sıklıkla ileri yaşlara kadar görülmeyebilir fakat epizodik brüt hematüri bazı hastalarda tespit edilmektedir. ADAS'lı bireylerin birçoğunda hematüri klinik bulgusu vardır. ADAS'ta proteinüri, özellikle ilerleyen yaşla birlikte sık görülür ve etkilenen bireyler ilerleyici böbrek hastalığı sergileyebilir (Malone et al., 2014).

ARAS'lı bireylerde kalıcı mikrohematüri vardır. Erkek ve kadınlar eşit olarak etkilenmektedir. ARAS ile ilişkili heterozigot *COL4A3* veya *COL4A4* patojenik varyantı olan kişilerde, kalıcı veya aralıklı mikrohematürinin tahmini %50 insidansı vardır. ARAS'lı çoğu hasta, ilk çocukluk veya erken ergenlik döneminde proteinüri ve 30 yaşından önce SDBY geliştirir. SDBY'ne ilerleme, ADAS'lı bireylerde (sıklıkla ileri yaşlarda görülür) XLAS veya ARAS'lı bireylere göre daha yavaş gerçekleşir (Hertz et al., 2015).

2.3.2 Göz

AS'li hastalarda yaklaşık olarak 3'e 1 oranında göz bulguları gelişmektedir. Yaklaşık olarak göz bulguları bulunan hastaların yaklaşık 3'de 2'sinde proteinüri gelişimi sonrasında görülmektedir (Coppo et al., 1998). Göz bulguları hastalığın seyrinde önemli bir klinik göstergedir. Oküler lezyonların spektrumu XLAS ve ARAS'ta benzer görünmektedir. ADAS'ta oküler lezyonlar nispeten nadir görünmektedir (Kashtan, 1999). Hastalarda göz bulguları olarak lens, kornea ve retinayı içeren göz bozuklukları bildirilmiştir (Savige et al., 2015).

Alport sendromlu hastalarda tipik oküler anormallikler benek retinopatisini, ön lentikonus'u ve kornea distrofisi içermektedir (Tan et al., 2010).



Şekil 2. 3 AS hastalarında tipik oküler bozukluklar. a) benek retinopatisi b) kornea distrofisi (Savige et al., 2015; Zhang & Ding, 2018).

En sık saptanan oküler değişiklik, XLAS'lı erkeklerin %85'inde ve kadınların %25'inde ve ARAS'lı hastaların %87'sinde meydana gelen periferik benek retinopatisidir (Shaw et al., 2007). Santral benek retinopatisi, XLAS'lı erkeklerin %60'ında ve kadınların %18'inde ve ARAS'lı bireylerin %87'sinde tanımlanmıştır (Fawzi et al., 2009; Wang et al., 2014). Fleck retinopatisi genellikle görme keskinliğini etkilemez ve retina fonksiyon testleri minör anormallikler gösterir veya normal görünür.

Anterior lentikonus, XLAS'lı erkeklerin %25-50'sinde görülür ve erken başlangıçlı böbrek yetmezliği ile ilişkilidir. Anterior lentikonus, AS'de patognomonikidir. XLAS veya ARAS'luların %15-20'sinde görülür ve tipik olarak geç ergenlik veya erken yetişkinlik döneminde belirginleşir (Ohkubo et al., 2003). Lentikonus'un klinik olarak tespit edilmesi, AS tanısını oldukça önemlidir. Lentikonus'un ilerlemesi görme bozukluklarına neden olabilmektedir (Liu et al., 2008). AS'li hastalarda kornea hastalığı nadir olmasıyla birlikte kornea erozyonları, kornea bulanıklığı ve posterior polimorf kornea distrofisi görülebilmektedir (Bower et al., 2009). Rhys ve arkadaşları yaptıkları çalışmada AS'li hastaların yaklaşık %20'sinde spontan akut oküler ağrı, lakrimasyon, fotofobi ve bulanık görme atakları ile karakterize tekrarlayan kornea erozyonu öyküsü olduğunu göstermişlerdir (Rhys et al., 1997). AS'li bireylerin yaklaşık %30'unda perimaküler benekler görülür. Alport sendromunda oküler lezyonlar yaygındır ve XLAS'lı bireylerin %30-40'ında görülür. Oküler lezyonların spektrumu XLAS ve ARAS'ta benzer görünmektedir. ADAS'ta oküler lezyonlar nispeten nadir görünmektedir. Kornea distrofisinin ilerlemesi bazı hastalarda görme kaybına neden olabilmektedir (Saika et al., 2002; Zhao et al., 2012).

AS'li hastalarda diğ er göz bulguları katarakt ve lameller veya kısmi kalınlıkta makula delinmeler dahil diğ er oküler anormallikler belirtilmiştir. Hem katarakt hem de makula delinmeleri görme kaybına neden olabilmektedir. AS'daki makula delinmeleri, cerrahi tedaviye iyi yanıt vermedikleri için sıklıkla kalıcı görme kaybıyla sonuçlanmaktadır (Liu et al., 2008; Rhys et al., 1997).

2.3.3 Kulak

Sensörinöral iş itme kaybı, sık görülen ve tipik bir böbrek dış ı klinik olarak görülmektedir ve iş itme kaybı asla doğ uş ta görülen bir klinik olmayıp sonradan klinik olarak kendini göstermektedir. Tipik olarak XLAS'lı erkeklerde ve ARAS'lı erkek ve kadınlarda geç çocukluk veya erken ergenlik döneminde odyometrik taramalarda görülmektedir (Barker et al., 1996). İş itme kaybının seyri varyantın tipine göre değı ş iklik göstermektedir ve iş itme bozukluğ una her zaman böbrek tutulumu eş lik eder. Fakat Böbrek hastalı ğ ı olmayan iş itme problemi olan erkeklerin Alport sendromunu çocuklarına aktarabileceğ ine dair ikna edici bir kanıt bildirilmemiştir. XLAS'lı erkeklerin %79'unda geliş miştir. XLAS'lı erkeklerde 30 yaş ından önce iş itme kaybı geliş me riski, *COL4A5* mutasyonunun tipi ile iliş kilidir (Jais et al., 2003). Missense mutasyonu olan erkeklerde risk %60, diğ er mutasyon türleri için ise %90'dır. 40 yaş ına kadar XLAS'lı erkeklerin %80-90'ında geliş tiğ i gözlemlenmiştir. XLAS'lı kadınların %28'inde, genellikle 30-40 yaş ından sonra ortaya çıkan iş itme kaybı gözlenmiştir (Jais et al., 2000).

İş itme kaybı ile böbrek tutulumu arasında bir iliş ki bulunmaktadır. Bu nedenle, iş itme kaybı böbrek yetmezliğ i geliş imi için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Çalış malarda AS'lı bireylerin %46.1'ine iş itme kaybı teş hisi konduğ u gösterilmiştir. Bunların arasında vakaların %11.5'i hafif, %34.6'sı orta düzeydeydi. Azalan iş itme, XLAS'lı erkek çocuklarda geç çocukluk veya erken ergenlik döneminde sıklıkla tespit edilebilmektedir. İlk aş malarda, iş itme kaybı 2.000 ila 8.000 Hz aralı ğ ındaki tonlara karşı hassasiyette iki taraflı azalma ile yalnız ca odyometri ile tespit edilebilmektedir. Etkilenen erkeklerde iş itme kaybı ilerleyicidir ve sonunda düşük frekanslarda dahil olmak üzere yüksek frekanslara kadar uzanmaktadır. İş itme kaybı genellikle ilk çocukluk evrelerinde rutin kontroller ile tanımlanabilmektedir. Ancak bazı ailelerde yaşam ın nispeten geç

dönemlerine kadar tespit edilemez. XLAS'lı erkeklerin %76.7'sinde ve kadınların %55,6'sında işitme kaybının meydana geldiğini gösterilmektedir. Ayrıca, vakaların %60,9'u hafif ve %30,1'i orta düzeyde olduğu gösterilmiştir (Alves & de Andrade Quintanilha Ribeiro, 2008; Chen et al., 2014).

AS'lu bireylerde kokleaların histolojik açıdan yaklaşıldığında korti organının baziler membran kısmına kusurlu olarak kaynaşmasından dolayı işitme kaybının olabileceği düşünülmektedir (Merchant et al., 2004).

2.3.4 Diğer Bulgular

Leiomyomlar; solunum, gastrointestinal ve dişi üreme yollarında iç organ düz kaslarının büyümesi ile karakterize iyi huylu tümörlerdir. *COL4A5*'in 5' ucundaki bitişik *COL4A6* genine uzanan bir kromozomal mikrodelesyon, X'e bağlı AS'li hastaların %2 ila %5'inde bildirilmiştir (Mothes et al., 2002; Uliana et al., 2011). *COL4A6* geninin düz kas farklılaşması ve morfogenezinde rol oynadığı bilinmesine rağmen, AS'li bir köpek modelinden alınan düz kas dokusunda $\alpha 6$ zincirlerinin gösterilememesi ve içinde leiomyomatozis bulunmaması, leiomyomatozis gelişiminin nerede konumlanabileceğini düşündürmektedir. *COL4A6* genin yakınında farklı fakat tespit edilmemiş bir gende patojenik varyasyon leiomyomatozis geliştirmiş olabileceği düşünülmektedir (Mothes et al., 2002). AS'nun yemek borusu ve trakeobronşiyal ağacın yaygın leiomyomatozisi ile birlikteliği onlarca ailede bildirilmiştir (Mothes et al., 2002). Diffüz leiomyomatozis Alport sendromunda çok nadirdir ve *COL4A5* ve *COL4A6* genlerinin 5' uçlarını kapsayan büyük delesyonlardan kaynaklanır ve X'e bağlı AS vakalarının yaklaşık %2-5'inde saptanır (Dahan et al., 1995; Shah & Weinberg, 2010). Semptomlar genellikle geç çocukluk döneminde ortaya çıkar ve disfaji, tokluk kusma, retrosternal veya epigastrik ağrı, tekrarlayan bronşit, dispne, öksürük ve hırıltıyı içerir. Az sayıda genç erkekte torakoabdominal aort anevrizması ve aort dilatasyonu bildirilmiştir (Kashtan et al., 2010; Lyons et al., 2007).

Böbrek biyopsi örneklerinin değerlendirilmesi, elektron mikroskopunun yanı sıra ışık mikroskopu ve rutin immüno Floresansı içermesi tanı değerlerini arttırmaktadır. Rutin immüno Floresan negatif veya spesifik olmayan

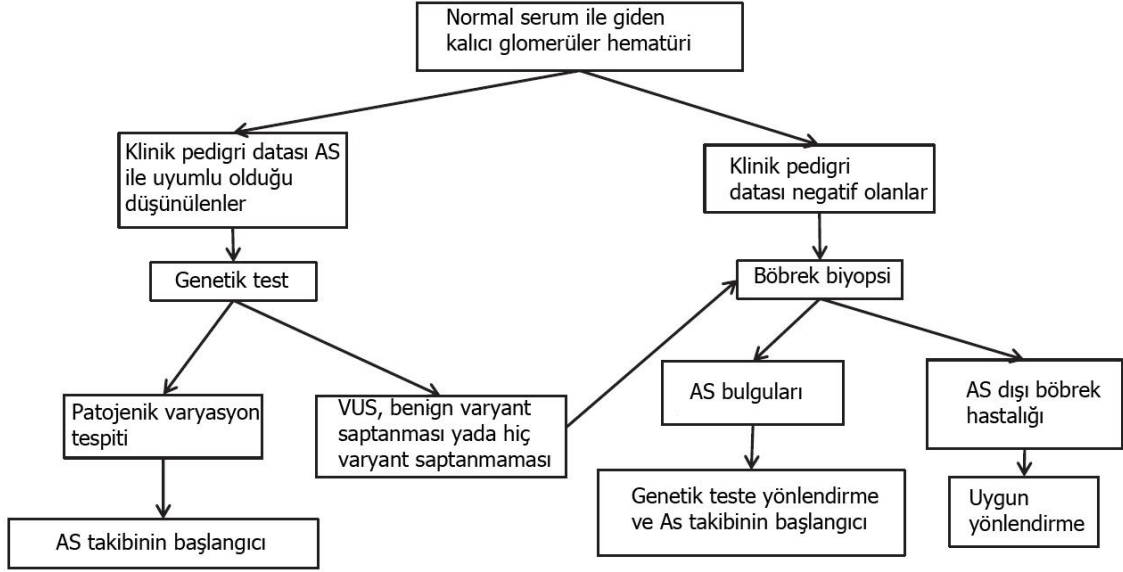
immünreaktan birikimi gösterdiğinde, kolajen IV immün boyama hem tanısal hem de prognostik bilgi sağlayabilmektedir (Gast et al., 2016; Wuhl et al., 2004). Elektron mikroskobu incelemesi yapılamasa bile boyama tekniği bulguların değerlendirilmesinde faydalıdır. Kollajen IV immün boyama ile cilt biyopsisi, X'e bağlı Alport sendromunun teşhisi için böbrek biyopsisine olası bir alternatiftir, ancak IgA'ı dışlamaz veya AS'nun kalıtım modelini açıklayamamaktadır. Fakat tanıya da çalışmaların limitasyonlarını en aza indirmek için genetik çalışmaların yapılması önem arz etmektedir (Kamiyoshi et al., 2016).

2.4 Sendromun Populasyonlardaki Dağılımı

AS dünyanın çok farklı bölgelerinde görülmüş ve genetik olarak heterojen bir sendromdur. Genel popülasyondaki insidansı bilinmemekle birlikte yaklaşık olarak 50.000'de 1 canlı doğumda görüldüğü bildirilmiştir. Birkaç seri çalışmalarından elde edilen veriler, pediatrik nefrologlar tarafından izole mikrohematüri için değerlendirilen çocukların yaklaşık beşte birinin Alport sendromu tanısı aldığını göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri Renal Veri Sistemine (ABDRVS) göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde SDBY'inde yetişkinlerin yaklaşık %0,2'si ve çocukların %3'ü AS tanısı taşımaktadır (Dagher et al., 2001). Çocuklardan alınan böbrek biyopsilerinde endikasyon insidansı %1-2 arasında değişmektedir (Gross et al., 2003).

2.5 Tanı

AS için idrar tahlili son derece önemli bir tarama yöntemidir. XLAS olan tüm erkeklerin yanı sıra ARAS tüm erkek ve kadınlarda kalıcı mikrohematüri vardır. XLAS için heterozigot olan kadınlarda, aralıklı olabilse de mikrohematüri olasılığı %95'tir (Moriniere et al., 2014). Daha detaylı teşhis için; aile öyküsü, hastanın muayenesine (göz, işitme, böbrek ve idrar analizleri) takiben moleküler genetik testlerde tanımlanan *COL4A3*, *COL4A4* veya *COL4A5*te varyant ya da varyantların tespit edilmesi sonrasında konur. Tanı değerlendirme ağacı literatürde şu şekilde verilmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4 AS takipli hastalara tanı koyulması için gereken tanı basamakları

Glomerülonefropati, değişken sensörinöral işitme kaybı, değişken oküler anomaliler, iyi huylu ailesel hematüri ve böbrek yetmezliği olmasına karşın sıklıkla böbrek yetmezliğine ilerleyen nefriti ve sensörinöral işitme en temel belirtilerindendir (Barozzi et al., 2020). Ayrıca renal biyopsiden alınan glomerüler bazal membranın (GMB) laminal densansındaki yoğunluk farkları AS için özgü bulgulardandır. Bu bulgular genellikle genç hastalarda gözlenmemekle birlikte 30 yaşından sonra ayrışmalar daha net biçimde görülmektedir (Hudson, 2004; Nozu et al., 2019). Tip IV kolajen proteinlerindeki farklılaşma için immüno Floresan boyama da kullanılmaktadır. GBM yapısında olan α 3-4-5 zincirlerinin yokluğunda veya anormal oluşumlarında GBM laminal bulgusu olmadan tanı konulabilmektedir. A5 zincirin tamamen yokluğunda XLAS tanısı koyulabilirken yanlış anlamlı (missense) varyasyonlarda biyopsi tanısı yeterli olmamaktadır (Gast et al., 2016; Wuhl et al., 2004). Bu bulgulara sahip hastalarda teşhisin kesin olarak konulabilmesi için genetik test sonucuna göre sendrom tanısı konulmaktadır (Kashtan & Gross, 2021).

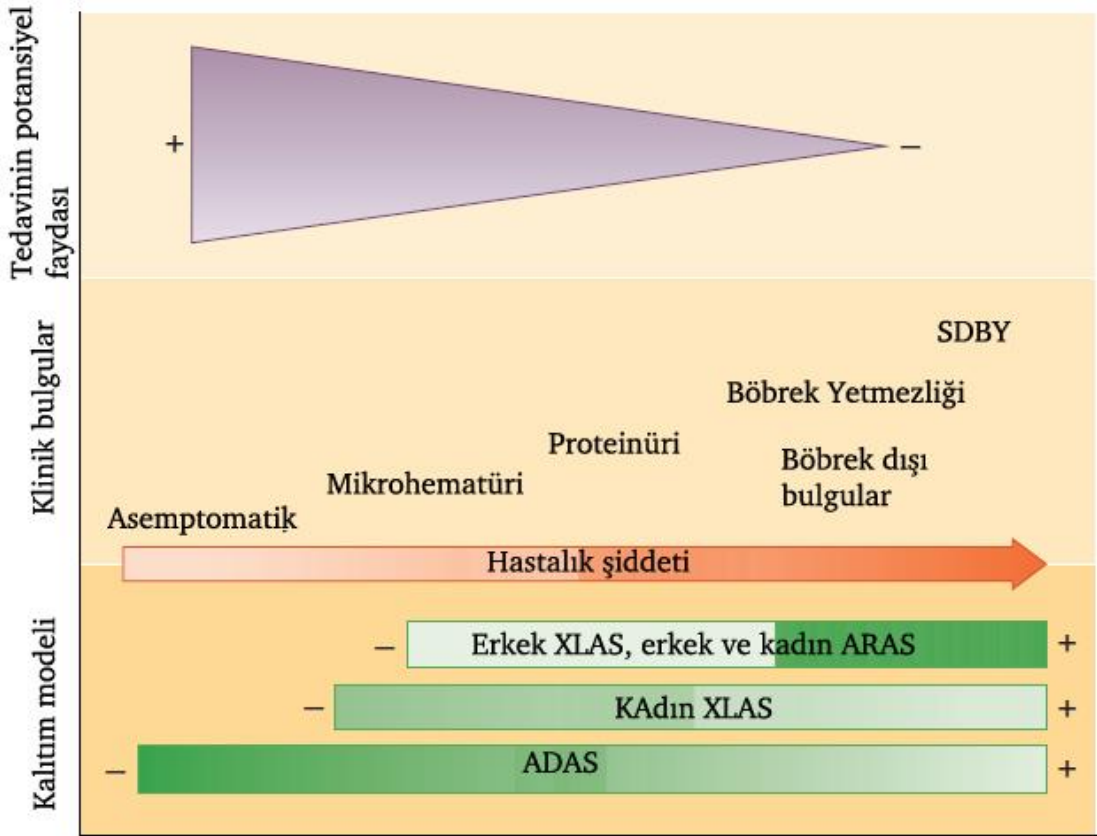
Son zamanlarda yapılan çalışmalarda tip IV patojenik varyasyonların farklı hastalıklarla da ilişkili olabileceği tespit edilmiştir. En çok bildirilenleri fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS) ve steroid-dirençli nefrotik sendrom (SRNS) hastalıklarıdır. Yapılan çalışmalarda hematüri ve nefrotik sendrom olgularında

COL4A3 ve *COL4A4* genlerinde mutasyon saptandığı ve FSGS histolojik bulgularının olduğu bildirilmiştir [26, 27]. Bu veriler ışığında FSGS ve SRNS hastalarının klinik verileri AS'den şüphelenmeyi gerektirmektedir. Bu yüzden bu hastalıkların tayini için hazırlanmış genetik panellerine AS ilişkili genlerinde eklenmesi değerlendirme için daha etkili olacaktır. Gereksiz farklı testlerin ve tedavilerin önüne geçilmesini sağlayacaktır (Kamiyoshi et al., 2016; Malone et al., 2014).

Hastalarda AS tanısı koyarken genetik çalışmalar sonucunda bazı hastalarda hiçbir varyasyona rastlanmayabilmektedir. Bu durum klinik olarak yanlış yönlendirmeler sonucunda çoğu laboratuvarlarda rastlanmaktadır. Çalışmamızda da bazı AS şüpheli hastalarda genetik olarak ilişkili mutasyonlara rastlanmamıştır. Bunun nedeni bazı genetik hastalık gruplarının AS ile karıştırılabilmelerinden kaynaklanmaktadır. Epstein, Fechtner ve Sebastian sendromları, May-Hegglin anomalileri, Fabry hastalığı ve Alport benzeri glomerülonefrit benzer kliniklerinden dolayı ileri tetkik ile bu hastalıklarla ilişki genlerin tekrardan değerlendirilmesi gerekmektedir (Heath et al., 2001).

2.6 Tedavi ve Takip

AS için spesifik bir modifiye edici tedavi bulunmamakla beraber bu gibi tedavilere ihtiyaç vardır. AS'da böbrek bulgusu olan hastalar için ideal olan GMB'nin yerini alacak, bütün yaşlarda uygulanabilecek, uzun yıllar uygulanabilen, ucuz, güvenlidir ve oral yoldan alınabilir bir ilaç olması lazımdır. Bu uygun ilaç için beklenirken yeterli bilimsel veriler ile jenerik ilaç denemelerinin yeniden başlatılmasına öncelik verilmesi uygun ilaca ulaşmaya yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Yüksek verimli fonksiyonel tahlillere dayanan kimyasal bileşik çeşitlerinin büyük ölçekli ilaç taraması da öncü bileşiklerin tanımlanması için önemli rol oynayacaktır. Ayrıca yeni CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi ve AS'li hastalardan elde edilen uyarılmış pluripotent kök hücre (iPSC)'lerin kullanımı, muhtemelen bu hastalık için hassas ve kişiye özel ilaçların gelişiminde katkısı olacaktır. Proteinürik ve lifli doğası nedeniyle AS, kronik böbrek hastalıklarına neden olan diğer birçok hastalığın sonucunu tahmin etmek için önemli bir hastalıktır (Torra & Furlano, 2019).



Şekil 2. 5 AS'de klinik görünüm ve tedavinin potansiyel etkisi. Üst: Hastalığın evresine göre tedavinin potansiyel etkisi. Şiddet arttıkça potansiyel etki sağa doğru azalır. Orta: AS'de bulunabilecek klinik özellikler. Klinik özellikler, sağa doğru daha fazla hastalık şiddeti anlamına gelir. Daha düşük: daha güçlü gölge, kalıtım modeline göre hastalığın daha sık ortaya çıkışını temsil eder (Torra & Furlano, 2019).

Alport sendromlu tüm bireylerin 6 ila 12 ayda bir nefrolog ile takibi, risk altındaki böbrek nakli olanların transplantasyon sonrası ilk yıl için anti-glomerüler bazal membran antikor aracılı glomerülonefrit gelişimi için aylık olarak izlenmesi, 6 ila 7 yaşından itibaren iki yılda bir çocukların odyolojik değerlendirilmesi, oküler anormalliklerin izlenmesi ve aort genişlemesi için değerlendirme yapılması önerilmektedir. Tekrarlayan kornea erozyonları olanlarda korneaların küçük travmalardan korunması ve yüksek gürültüye maruz kalmayı en aza indirilmesi gerekmektedir. İlerleyici nörosensöriyel işitme kaybı ve kataraktın rutin tedavisi için semptomatik leiomyomlar için cerrahi müdahale tavsiye edilmektedir. Aile öyküsünde AS bulunan bireylerin idrar tahlili ile ve ailedeki mutasyon(lar)

biliniyorsa moleküler genetik test ile değerlendirilmesi tavsiye edilmektedir (Kashtan & Gross, 2021).

XLAS hastalığı olan tüm erkekler ve ARAS'lı tüm erkek ve kadınların yanı sıra ADAS'lı hastaların belirli bir yüzdesi nihayetinde SDBY'ne ilerleme gösterecektir. SDBY'ni geciktirmek hastalık için önerilen uzun zamandan beri kullanılan tek tedavi renin anjiyotensin aldosteron sistemi (RAAS) blokajı olduğu düşünülmektedir. Böbrek yetmezliği görülen hastalarda ise böbrek nakli önerilmektedir. Nakil sonrası oluşabilecek nefrektomiden kaçınmak için canlı donörlerden alınan böbreklerin kullanılması daha uygun olacaktır (Savige et al., 2013). Denetleyici kurumlar tarafından teknik olarak onaylanmamasına rağmen, RAAS inhibitörlerinin, proteinürik nefropatileri olan yetişkin hastalarda, anti-proteinürik etkilerinin ötesinde anti-proteinürik etkilere sahip oldukları için, RAAS inhibitörlerinin Evre 5 kronik böbrek hastalığında ilerlemeyi geciktirdiği gösterildiğinden, RAAS blokajı tüm proteinürik hastalıklar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin (ACE-I'ler) AS'de faydalı bir etki gösterdiğine dair ilk kanıt 1997'de Grodecki ve ark. X'e bağlı kalıtsal nefritli bir Samoyed köpek modelini enalapril ile başarıyla tedavi etmiştir (Grodecki et al., 1997). AS için AS'li farelerde böbrek hasarının erken dönemde, böbrekte RAAS bileşenlerinin ekspresyonundaki belirgin değişikliklerle ilişkilendirilmiş. Bae et al. yabanıl tip (WT) farelere kıyasla 7 haftalık COL4A3 mutasyonlu farelerin böbreklerinde renal anjiyotensin II (Ang II) seviyesinde belirgin bir artış ve Ang-(1-7) seviyesinde bir düşüş tespit edilmiştir (Bae et al., 2017). İnsanlarda RAAS blokajının etkinliğinin ilk çalışması, küçük bir pediatrik kohortta gerçekleştirilen retrospektif bir gözlemsel çalışmada belirtilmiştir (Proesmans et al., 2000).

Günümüzde AS, ilaç firmalarının hedefi haline gelmiş ve bu hastalık ile alakalı ilaçlar geliştirme çabasına girmişlerdir. Bu ilginin sebepleri; proteinüri ve fibrozis ile diğer kronik böbrek yetmezliklerine göre daha iyi tahmin edilmesi kolay olması, bu hastalık için onaylanan herhangi kesin bir ilacın olmaması, tedavi edilecek hasta sayısının çok fazla olması, hastaların genç yaşta fenotipik olarak belirlenebilir olması ve AS için onaylanmış bir tedavi olmaması. Tüm bu sebepler AS için bir tedavi arayışını teşvik etmektedir (Torra & Furlano, 2019).

Günümüze kadar AS tedavisi için farklı yaklaşımlar içeren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bunlardan en çok öne çıkanlar; bardoksolon, anti-miRNA-21, lipid seviyesini düşüren kimyasallar, parikalsitol, epidermal büyüme faktörü reseptör inhibisyonları, şaperonlar, kök hücre temelli tedaviler ve diğer terapiler şeklindedir.

Bardoksolon metil, Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1'den (KEAP1) nükleik faktör (eritrositten türetilen) benzeri 2'yi (Nrf2) serbest bırakarak etki eder ve aktif B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir güçlendiricisini baskılamasına izin vermekte ve birçok anti-inflamatuar ve antioksidan genin transkripsiyonunu aktive etmektedir. En önemlisi, bardoksolonun globüler filtrasyon oranı'nı (GFR) artırma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Klinik öncesi modellerde, GFR'de bardoksolonun neden olduğu artışlar, glomerüler inflamasyonun baskılanmasından dolayı glomerüler yüzey alanındaki artışlara bağlanmıştır. 2011 yılında, bardoksolonun, 52 haftalık bir süre boyunca Tip 2 diyabet ve Evre 3 kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda tahmini GFR'yi (eGFR) artırdığı gösterilmiştir (Pergola et al., 2011).

MikroRNA'lar (miRNA), transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen ve farklılaşma, çoğalma ve apoptoz dahil olmak üzere önemli biyolojik süreçleri modüle eden küçük kodlamayan RNA'lardır. Hedeflenen gen ifadelerinin bozulması ve translasyonel baskı dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar aracılığıyla işlev görürler (Kim & Nam, 2006). Böbreklerde miRNA'ların kritik bir rolü olduğuna dair klinik ve hayvan patofizyoloji çalışmalarından elde edilen çalışmalar olduğu bildirilmiştir (Chung et al., 2013). Spesifik olarak, AS hastalarında up-regüle edilmiş miRNA'yı tanımlayan çalışmalar bulunmaktadır (Chen et al., 2019). Böbreklerde dahil olmak üzere birçok organdaki fibrojenik hastalıkların patogenezinde katkıda bulunan ve yaralanma sonrası doku onarımında miRNA-21 aktif rol aldığı düşünülmektedir. Oligonükleotit kimyasının geliştirilmesindeki ilerlemeler, anti-mikroRNA-21 gibi spesifik miRNA'lara karşı yönlendirilmiş mühendislikle oluşturulmuş oligonükleotitlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. AS'nin bir fare modelinde, bu anti miRNA-21 molekülünün, metabolik yolları uyararak Alport nefropatisinin ilerlemesini önlediği gözlenmiştir (Gomez et al., 2015).

Statinler, genel popülasyonda kardiyovasküler hastalıkların birincil ve ikincil önlenmesinde kullanıldığı, ancak bunların kronik böbrek hastalıklarında ilerlemesi üzerindeki etkileri tartışmalıdır. Fakat AS'li farelerde, 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim-A inhibitörü serivastatin, böbrek yetmezliğini ve üremiyi geciktirerek farelerde yaşam sürelerini uzattığı bildirilmiştir. Bu etkiler, azalmış renal fibroz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunda bir azalma ile ilişkilendirilmiştir. Serivastatin, yan etkileri olmasına ve tüm AS hastalarına statinlerle tedavi önermek için yetersiz olduğu göz önünde bulundurularak hastalar üzerinde kullanımı durdurulmuştur. Fakat AS'li ve yeni başlayan hiperkolesterolemili yetişkin hastalarda, statinler böbrek yetmezliğini geciktirmek ve önlemek için ek bir tedavi seçeneği olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Koepke et al., 2007).

D vitamini reseptör aktivatörü olan parikalsitol, hiperkalsemiye neden olmadan parathormonu baskılamak için gereken minimum dozun üzerindeki dozlarda renin ekspresyonunu azalttığı gözlemlenmiştir (Fryer et al., 2007).

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), önemli tirozin kinaz reseptörlerinden biridir ve ErbB ailesine aittir. EGFR sinyali, tümörün ilerlemesinde önemlidir, ancak diyabet ve kalp fonksiyon bozukluğu gibi kanserli olmayan çeşitli hastalıklarda da rol oynar. Böbrek hastalıkları ile ilgili olarak, deneysel bir nefrit modelinde EGFR'nin baskılanmasının etkili olduğu kanıtlanmıştır (Bollee et al., 2011).

Bir şaperon, katlanmamış veya kısmen katlanmış proteinlere bağlanarak ve bunları stabilize ederek proteinlerin uygun şekilde katlanmasını kolaylaştıran bir moleküldür. Gündük protein veya proteinin ifade edilmediği durumlarda şaperonlar işlevini yerine getirememektedir. Fakat AS genlerindeki mutasyonların yaklaşık %50'si yanlış anlamlı (missense) mutasyon olduğundan bu varyasyonları taşıyanlarda şaperon üzerinden yaklaşım olumlu sonuçlar vereceği düşünülmektedir (Bekheirnia et al., 2010). AS'de bir şaperon üçlü sarmal oluşumunda görev alarak yanlış katlanmış kolajen IV proteinlerinin optimum katlanmanın altında olsa da dirençli bir GBM oluşturmak için yeterli işlev görmesine yardımcı olabilmektedir (Chen et al., 2013). Şaperonların çeşitli

hastalıklarda etkili olduğu kanıtlanmıştır. Kalıtsal böbrek hastalığı olan Fabry hastalığı için migalastat şaperonları için halihazırda ticari bir şaperon kullanılmaktadır (Germain et al., 2016).

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC) genetik hastalıkların tedavisinde kullanılan ideal bir yaklaşım olarak öngörülmektedir. Teoride, iPSC'ler, türetildikleri bireyle immüno-uyumlu olacak doku veya organları oluşturmak için kullanılabilir. iPSC teknolojisi, hastalık modellemesi ve gen tedavisi için çeşitli bozukluklarda kullanılmıştır. AS'de kök hücre temelli tedavinin mantığı, sağlıklı donörlerden izole edilen kök hücrelerin, böbrek fonksiyonunu uzatmak için yeni bir fonksiyonel GBM üreterek, fonksiyonel podositlere farklılaşabilecekleri renal glomerüllerde göç etmesi ve engraftasyon yapmasıdır. iPSC hatları, AS patomekanizmalarını ve ilaç testlerini incelemek için faydalı bir kaynak olarak sunulmaktadır (Kuebler et al., 2017a, 2017b).

AS'de böbrek fonksiyon bozukluğunun ilerlemesini düzenleyen anahtar moleküller ve hücre sinyal yolları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Fakat proinflamatuvar sitokinlerin ve profibrotik genlerin upregülasyonunun, kronik böbrek hastalıklarına faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Meehan et al., 2009; Yokota et al., 2018).

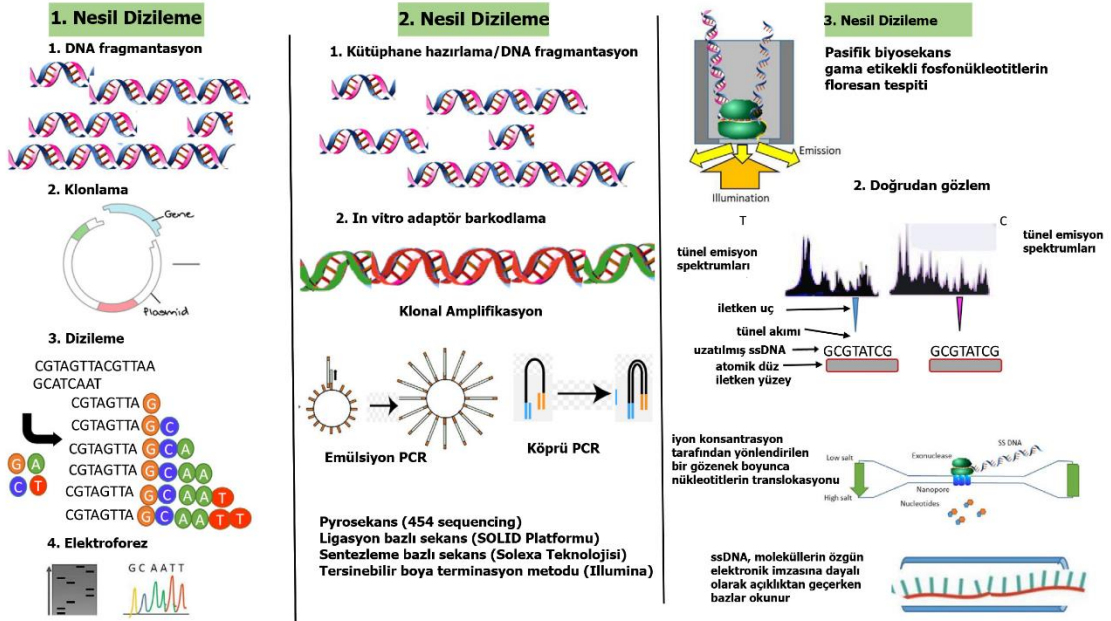
2.7 Yeni Nesil Dizileme (YND) (Next Generation Sequencing, NGS)

Dizileme, canlıların genetik materyali olan nükleik asitlerin (DNA, RNA) nükleotitlerinin sıralanarak belirlenmesi sürecidir. Genom çalışmaları için dizileme yapılması en önemli basamağı oluşturmaktadır. Birçok farklı genom, hastalık ve keşif üzerine yapılan araştırmalar, dizileme ve dizileme teknolojilerindeki ilerlemelerden kaynaklanmıştır. Dizileme ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi daha farklı alanların doğmasına ve biyoinformatik araçların daha da önem kazanmasına sebebiyet vermiştir (Rizzo & Buck, 2012; Voelkerding et al., 2009).

Günümüzde varyasyonların tanımlanması ve diğer dizileme sistemlerinden çıkan varyasyonların konfirmasyonu için altın standard yöntem Sanger dizileme olarak bütün literatürler tarafından kabul edilmiştir. Bu yöntem ilk kez 1970 yılında İngiliz kimyacı Frederick Sanger tarafından geliştirilmiştir (Sanger et al., 1977,

1992). Bu buluş ile genetik dizileme ve tetkikinde çığır açmış ve nobel ödülü almıştır. Sanger dizileme, nükleotid özelleşmiş zincir sonlandırıcı inhibitörlerin DNA'nın spesifik dizisini belirlemesi temeline dayanmaktadır (Petersen et al., 2017). Birinci nesil dizileme tekniği olarak benimsenmiştir. Bu teknik insan genom projesi yürütülerek şu anda kullanılan ve literatürde kabul gören insan genom referans dizisi elde edilmiştir (Smith, 2017). Bu teknolojinin en önemli kısıtlılıkları; yüksek maliyeti, uzun zaman alması ve düşük çıktıya sahip olması nedeni ile kısa dizilemeler ve az örnek sayılarında kullanılmasında yaygınlaşmıştır. Ayrıca günümüzde geniş ölçekli olan dizilemelerde konfirmasyon için kullanılmaktadır. Fakat yeni nesil dizileme bu kısıtlılıkları ortadan kaldırmasına karşın ikinci nesil dizilemenin en büyük dezavantajları ise kısa okumaların (DNA fragmanlarının oluşması) hizalama sürecinin uzun olması ve okuma esnasında dizileme hatalarının Sanger dizilemeye göre daha fazla olmasıdır (Petersen et al., 2017; Rizzo & Buck, 2012; Voelkerding et al., 2009). Bu nedenle geniş ölçekli dizilemeler için uygun bir teknoloji değildir. Bunun için yeni nesil dizileme olarak adlandırılan ikinci nesil dizileme yöntemleri keşfedilerek kullanımları yaygınlaşmıştır (Petersen et al., 2017). Yeni nesil dizileme verileri farklı platformlarda üretilebilmektedir. En sık kullanılan Illumina ve Ion Torrent platformlarıdır.

2000'li yılların başında geliştirilen yeni nesil dizileme teknolojisi, önceki dizileme teknolojilerine kıyasla tüm genomu daha kısa sürede ve daha düşük maliyetle dizileyebilmektedir (Petersen et al., 2017). Maliyet ciddi anlamda azaltılmış olup Tüm Genom Dizileme'de (Whole Genome Sequencing, WGS), tüm genom tespit edilirken, Tüm Ekzom Dizileme'de (Whole Exome Sequencing, WES) ve yeni nesil dizileme panelleri insan genomundaki tüm ya da istenen genlerin protein kodlama bölgelerini (ekzonlar) tespit etmek için kullanılabilir (Petersen et al., 2017).



Şekil 2. 6 DNA dizileme teknolojilerinin çeşitleri (Dlamini et al., 2020).

Birinci nesil dizileme veya Sanger dizileme, hedef DNA'nın plazmit vektörlerine parçalanmasını ve klonlanmasını içermektedir. DNA daha sonra radyo izotopik olarak etiketlenmiş veya floresan olarak etiketlenmiş dNTP'ler ile bir döngüsel zincir sonlandırma yöntemi kullanılarak dizilenmektedir.

İkinci nesil dizileme teknolojilerin tümü sentez yoluyla dizilemeye dayanmaktadır. Kullanılan iki yaygın yöntem, emülsiyon PZR ve köprü PZR'dir. Bu yöntemlerin ardından farklı platformların farklı dizileme teknolojileri kullanılmaktadır. Günümüzde 1000 baz uzunluklu DNA fragmanlarını okumada en başarılı iki platform Illumina ve Thermo Fisher Scientific şirketlerinin ürettiği platform en çok tercih edilen 2 ana sağlayıcı olarak karşımıza çıkmaktadır (Li et al., 2017; Tucker et al., 2009).

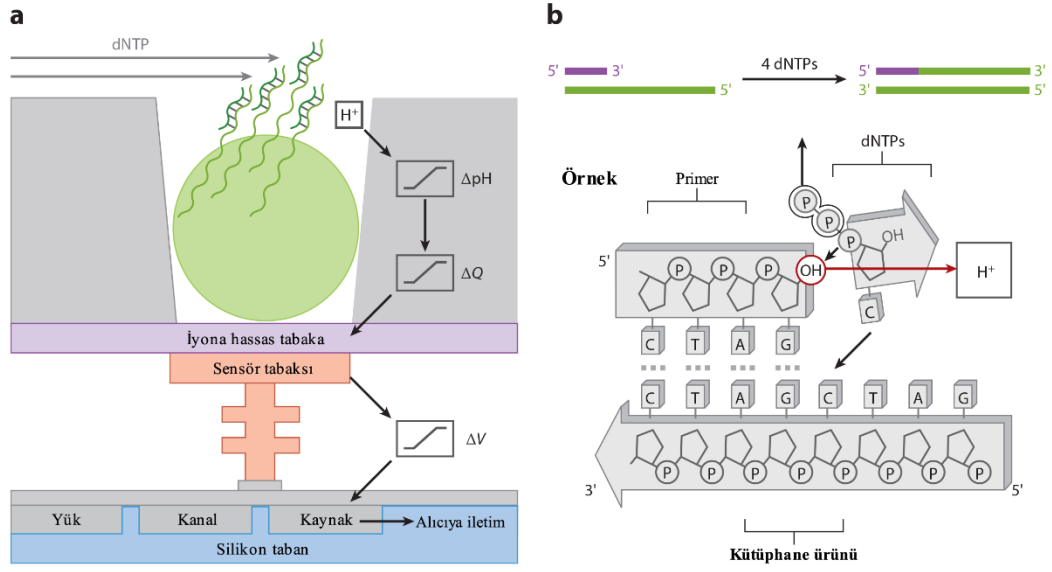
Üçüncü nesil dizileme yöntemleri birçok farklı firma tarafından geliştirilmiş ve farklı teknolojilere dayanmaktadır. Hedef DNA'nın doğrudan dizilenmesinin önünü açmaktadır (Dlamini et al., 2020).

Yeni nesil dizileme sürecinden çıkam ham verilerin analizleri ise temel olarak 5 aşamada (Pabinger et al., 2014) gerçekleşmektedir:

- Verilerin Kalitesi: Bu adım, yeni nesil dizileme platformlarından elde edilen ham verinin kalitesini değerlendirerek, tanımlanmış standartları karşılamayan okumaların düzeltilmesi, kaldırılması veya doğrulanmasıdır.
- Hizalama ve Birleştirme (assembly): Bu adım, meydana gelen çok sayıda örtüşen kısa okumaları birleştirerek orijinal diziyi yeniden oluşturma işlemidir (Cunha et al., 2015). Yöntem, insan çalışmalarında insan genomu referans alınarak yapılmaktadır. Hizalama aslında bilgisayar biliminde bir dizi eşleştirme adımıdır, ancak diziler için tam bir eşleşme üretilmesi amaçlanırken, tam eşleşmenin olmadığı ve hızlı eşleşmenin mümkün olduğu hizalamadaki olası varyasyonları bulmak amaçlanır (Bao et al., 2014). Okumaların yüksek verimlilik ve hassasiyetle referans genomla hizalanması gerekmektedir. Hizalama ve birleştirme yapılırken muhtemel problemler ise kısa okumalar, tekrarlayan diziler ve büyük ölçekli polimorfizmlerdir (Ulahannan et al., 2013; Voelkerding et al., 2009).
- Varyasyonların Tanımlanması: Bu adım, referans genomu ile hizalanmış diziyi, incelenen genom ile karşılaştırarak dizi farklılıklarını bulma işlemidir.
- Varyasyonların Analizi: Tanımlanan varyasyonların arasından hangilerine odaklanılacağını seçmek için anlamlı olanların belirlenmesidir. Bunun için daha önce oluşturulmuş ve web tabanlı farklı varyasyon veritabanları kullanılmaktadır (Cunha et al., 2015). Ya da laboratuvar içinde oluşturulmuş ve genişletilmiş veri tabanı da kullanılabilir.
- Dizilemenin Görselleştirilmesi: Görselleştirme YND verilerinin analiz edilmesiyle elde edilen verileri yorumlamak için kullanılabilir. Annotasyon (Açıklama, Anlamlandırma) adımı ile elde edilen varyasyonlar bir görselleştirme aracı ile değerlendirilebilir. Bu adım varyasyonun kalitesi açısından da fikir vermektedir. Hali hazırda en çok kullanılan görselleştirme programı olan Integrative Genomics Viewer (IGV) kullanılmaktadır. Çalışmamızda da bu program kullanılmıştır (Thorvaldsdottir et al., 2013).

2.8 Thermo Fisher Scientific Ion Torrent PGM Sistemi

Bu sistem Thermo Fisher Scientific tarafından 2011 yılında ilk defa kullanılan bir platformdur (Bragg et al., 2013). Ion Torrent platformu yarı iletken dizileme tekniği ile data üretmektedir. Bu platformda PZR ve kütüphane oluşturma aşamaları diğer platformlara benzemekle birlikte varyasyonların tespitinde diğerlerinden çok daha farklı bir sistem kullanmaktadır (Loman et al., 2012; Rothberg et al., 2011). Bu sistemde varyasyonların tespiti iyon değişimine duyarlı elektronik sistem aracılığı ile DNA polimerazın DNA zincirinde nükleoid eklenmesi ile ortaya çıkan H^+ iyonlarının pH metre yardımı ile tespit etme yöntemi kullanılmıştır. Sistem örnekler üzerine nükleotidlerin içeriğinde bulunan organik bazları sırası ile örnekler ekleyerek iyon değişimlerine bakmaktadır. DNA üzerinde nükleotid eklenmediğinde voltaj değişmediğinden o nükleotidin sırada olmadığı anlaşılmaktadır. Nükleotid eklenmesinde voltaj değişimini cihaz tarafından okunarak hangi bazın bağlandığı tespit edilmektedir. DNA dizileme sırasında floresan boyalı nükleotidler ve optik kamera ile okuma olmayan sistem ilk olarak bu platformda kullanılmıştır (Eduardoff et al., 2015). Diğer platformlardan farklı olarak ayrıca kütüphane oluşturma sırasında kullanılan emülsiyon PZR tekniğinin kullanılmasıdır. Bu platformun diğerlerine göre avantajı uzun nükleotid dizilerinde temiz okumaların kalite açısından tatmin edici, analizinin hızlı, ucuz kolay iş akışının olmasıdır. Fakat dezavantajı ise holopolimerlerde yüksek oranda hataya meyilli olmasıdır (Schadt et al., 2010; Yang et al., 2014). Bu sistemde en fazla hata durumu tekrar eden nükleotid dizilerinin okunması sırasında ortaya çıkmaktadır (Bragg et al., 2013; Flusberg et al., 2010).



Şekil 2. 7 Ion torrent platformunun hidrojen iyonu temelli çalışma prensibi (Mardis, 2013).

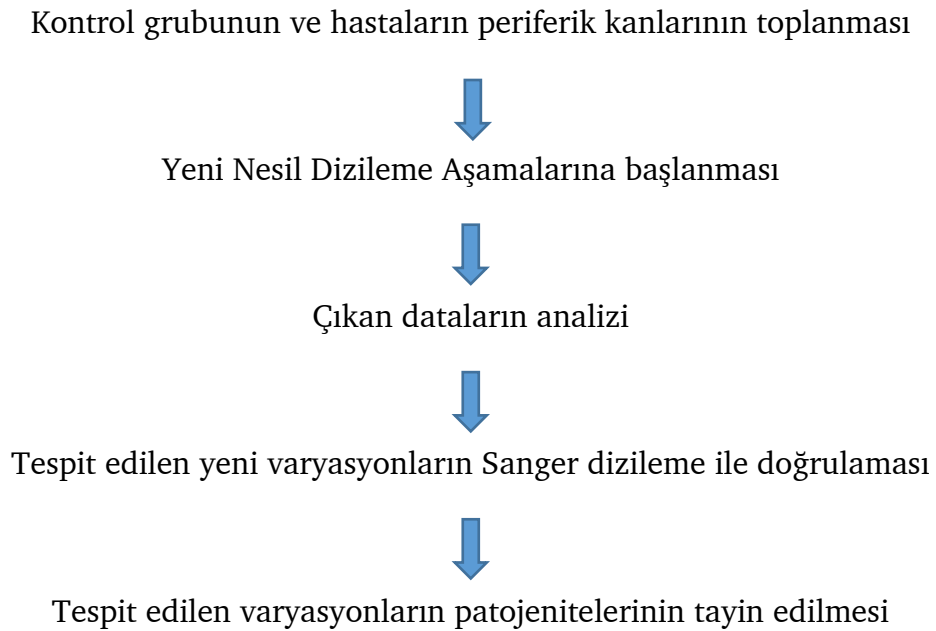
3.1 Materyal

Haseki Eğitim Araştırma ile Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Genetik Tanı Merkezlerine Türkiye'nin farklı bölgelerinden gelen 125 AS şüpheli ve klinik belirtilerden en az bir tanesini gösteren bireyler seçildi. Çam ve Sakura Şehir Hastanesinden E-96317027-000-8273 2021.03.02/KAEK kurul kararı ile etik kurul alındı. Çalışmalar için hastalar, kontrol grubu ve aileleri bilgilendirilerek onamları alındı. Kontrol grubu örnekleri ise AS ile ilgili hiçbir klinik belirti göstermeyen 45 bireyin periferik kanlarından izole edilmiş DNA'larından elde edilen veriler kullanıldı.

3.2 Metod

Periferik kanlarda elde edilen DNA'lardan AS ile ilişkili olan genlerdeki (*COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*) varyasyonlar yeni nesil dizileme yöntemi ile tespit edilerek kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Çalışmanın akış şeması;



3.2.1 DNA izolasyonu

DNA'ların izolasyonu PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (LOT:2160846-REF:K1820-02) kullanılarak yapıldı. Protokol basamakları aşağıdaki gibi takip edildi.

- DNA izolasyonu başlamadan etüv 55 °C ye ayarlandı.
- Steril mikrosantrifüj tüpüne 200 µl tam kan eklendi.
- Kanın üzerine 20 µl Proteinaz K eklendi.
- Karışıma 20 µl RNase A eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dk. bekletildi.
- Daha sonra karışıma 200 µl pureLink Genomex Lysis/Binding Buffer eklendi ve vortekslendi.
- Örnekler 55 °C ye getirilmiş etüve yerleştirildi ve 10 dk. inkübasyona bırakıldı.
- Örneklerin bulunduğu karışıma 200 µl etanol eklendi ve homojen bir karışım oluşana kadar vortekslendi.
- Kitin içeriğinde bulunan spin kolonuna lizat eklendi.
- Kolon 13.000 rpm de 1 dk. boyunca santrifüj edildi.
- Alttaki 2 ml'lik toplama tüpü atılarak, PureLink Spin kolon, 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 500 µl Wash Buffer tamponu eklenerek, 13.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
- Alttaki 2 ml'lik toplama tüpü atılarak, PureLink kolonu 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 500 µl Wash Buffer 2 tamponu eklenerek, 13.000 rpm'de santrifüj edildi.
- Membranın kurumasını sağlamak için, PureLink kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek 14.000 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi.
- PureLink kolon, 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek, 50 µl PureLink Genomic Elution Buffer eklendi, oda sıcaklığında 3 dk. inkübe edildikten sonra, 13.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.

3.2.2 İzole Edilmiş DNA'ların Ölçülmesi

İzolasyon sonrası çalışmaya alınacak DNA örneklerinin yoğunlukları Qubit dsDNA HS Assay Kit ile florometrik yöntemle (Qubit® 3.0 Fluorometer) ölçüldü ve son DNA yoğunluklarının yeni nesil dizileme için istenen aralıkta (1,6-2 ng/ μ l) olması sağlandı. Ölçüm aşağıdaki basamaklar takip edildi.

- Qubit Reagent 1:200 oranındaki çalışma solüsyonu hazırlandı.
- Qubit Assay tüplere 198 μ L Working Solution üzerine 2 μ L izole edilmiş DNA eklenerek 10 sn. iyice karıştırılarak en az 2 dk. beklendi.
- Qubit® 3.0 Fluorometer cihazında ölçüm gerçekleştirildi.
- Ölçümden önce hava kabarcıkları giderildi (spin) ve tüpün alt kısmı temizlendi.
- Qubit cihazında ölçüm yaparken sırası ile bu seçenekler seçildi: dsDNA-High Sensitivity- Run Samples: 2 μ L. Eğer DNA miktarı çok ise TOO HIGH, ölçülemeyecek kadar az ise TOO LOW uyarısı verebilir. Buna göre örnek hacmi artırılıp azaltılmalıdır.

3.2.3 Yeni Nesil Dizileme Aşamaları

Hedef bölge Ion AmpliSeq Alport 1 and Alport 2 panel pooları kullanılarak, Ion Ampliseq Library Kit 2.0 (Life Technologies) ile firma protokollerine uygun tabloda gösterildiği şekilde yapıldı.

Primer Havuzu Hazırlık Karışım Hazırlama

Tablo 3. 1 Her bir örnek için kullanılan PZR solüsyonları

İçerik	Hacim
5x Ion AmpliSeq HiFi Mix	2 μ l
2X Ion AmpliSeq Primer Pool	5 μ l
gDNA (1,6-2 ng/ μ l)	1 μ l
Nükleazdan Arındırılmış Su	2 μ l
Toplam	10 μ l

Hazırlanan karışım Termal Cyler cihazında tablodaki program uygulandı.

Tablo 3. 2 Hedef bölgenin çoğaltılması için kullanılan termal program

Sıcaklık	Süre	Basamaklar
99 °C	2 dk	Enzim Aktivasyonu
99 °C	15 sn	Denatürasyon-Bağlanma ve uzama (20 döngü)
60 °C	4 dk	
4 °C	∞	Bekleme

Bekleme noktası 24 saat boyunca PZR ürünleri bekletildi. Uzun süreli beklemler için -20°C ortamda bekletildi.

Termal döngü sonunda aynı örneklere ait farklı primer havuzlarında PZR ile çoğaltılmış Ürünler tek bir tüpte birleştirildi. Bir sonraki aşama için hazır hale getirildi.

3.2.3.1 Ürünlerin Enzimatik Yöntemle Temizlenmesi ve Kesimi (Pürifikasyon)

Bu aşamada ürün içinde bulunan fazlalık primerleri ve bağlanma olmayan nükleotid parçalarını temizlemek için önceden birleştirilmiş ürünler üzerine (20 µl) 2.5 µl FuPa Reagent eklenerek tablo 3'deki program uygulandı.

Tablo 3. 3 Primer dizilerinin kesimi ve temizlenmesi için kullanılan termal program

Sıcaklık	Süre
50 °C	10 dk
55 °C	10 dk
60 °C	20 dk
4 °C	Bekleme

Bekleme noktası; 4 °C'de en fazla 1 saat beklenirken, uzun süreli bekleme -20 °C'de bekletildi.

3.2.3.2 Barkod ve Adaptörlerin Bağlanması

Birden fazla örnek çalışıldığı için her bir örnek farklı barkodla işaretlendi. Her bir barkod (Ion Xpress™ Barcode X¹) 1:4 oranında seyreltilerek kullanıldı.

Tablo 3. 4 Örnek barkod adaptör karışımı

İçerik	Hacim
Ion P1 Adapter	2 μ l
Ion Xpress™ Barcode X ¹	2 μ l
Nükleazdan Arındırılmış Su	4 μ l
Toplam Hacim	8 μ l

Primer dizilerinin kısmi temizlenmesinden sonra elde edilen her ürün başına tablo 5'de gösterilen hacimde ekleme yapılarak, Tablo 6'da gösterilen program kullanılarak barkod-adaptörlerin ligasyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3. 5 Barkod-adaptör ligasyon karışımı

İçerik	Süre
Switch Solüsyonu	4 μ l
Seyreltilmiş Ion Xpress™ Barcode X ¹	2 μ l
DNA Ligaz	2 μ l
Toplam	8 μ l

Tablo 3. 6 Ligasyon için kullanılan termal program

Sıcaklık	Zaman
22 °C	30 dk
72 °C	10dk
10 °C	Bekleme

Bekleme noktası; 10 °C'de 24 saat bekletilirken, uzun süreli bekleme gerektiğinde -20 °C' de bekletildi. Barkod-adaptörlerin ligasyonu sonrasında çoğalmamış kütüphane ürünlerinin saflaştırılması aşamasına geçildi.

3.2.3.3 Kütüphane Ürünlerinin Pürifikasyonu

Bu aşamada Agencourt® AMPure® XP Reagent ve taze hazırlanmış % 75'lik etanol kullanıldı. AMPure XP Reagent oda sıcaklığına getirildi. Beadler iyice vortexlendi ve tamamen dağılana kadar yavaşça pipetaj yaparak kullanıldı. Her bir örnek PZR plate içine alınmış ürünlerin üzerine toplam 45 μ l Agencourt® AMPure® XP Reagent eklendi (1,5 katı olacak şekilde). Plate 10-15 saniye 1000-1500 rpm arasında vorteklendikten sonra hafif spin atıldı. Plate oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plate manyetik stand alınarak karışımın tamamen temizlenmesi beklendi. 8 kanallı mikropipet kullanılarak pellete zarar vermeden supernatantlar atıldı. Eğer pipetleme esnasında kahverengi beadlerin de çekildiği görülürse hacim geri bırakılır tekrar temizlene kadar beklenir ve pipetleme yapılır. 100 μ l taze %70'lik etanol eklendi (beadlerin üzerinin kapanması yeterlidir). Manyetik stand üzerinde yıkama yapıldı. Beadler tamamen kuyucuk çeperlerine yapıştıktan sonra pellete zarar vermeden supernatantlar atıldı. Bu pürifikasyon adımları 2 kere tekrar edildi. Son kalan damlacıkları 1-10 μ l'lik 8 kanallı mikropipet ile alınarak 3 dakika oda sıcaklığında iyice kuruması beklendi. Manyetik stand üzerinde kuyucuklardaki beadlerin üzerine Qubit ölçümü için Super Mix Hi Fi ve Amplification Primer Mix reaktifleri eklenerek diğer aşamalara geçildi.

3.2.3.4 Kütüphane Ürünlerinin Qubit Ölçümü

Ürünlerin ölçülebilmesi için bir dizi termal cihaz işleminden geçmesi gerekmektedir. Ürünlerin miktarının artırılması için PZR yapılarak hem sonraki aşamalarda kullanılır hemde ölçüm için gereken yoğunluğa erişilir. Temal cihaza koyulmak üzere aşağıdaki tabloda belirtilen reaktifler ile karışımlar hazırlanır ve önceden alınan supernatanlar üzerine koyularak termal cihazında uygun protokolda yürütülür.

Tablo 3. 7 Kütüphane ürünlerinin PZR uygulamasında kullanılan reaktifler

İçerik	Hacim
Super Mix Hi Fi	50 μ l
Amplification Primer Mix	2 μ l

Her bir kuyucuğa karıştırılmış reaktifler eklendi. Plate iyice vortex ve spin atıldı. Manyetik stand üzerine tamamen temizlenene kadar beklendi. Alınan supernatant tamamen yeni bir plate alınarak uygun termal cihaz protokolünde bekletildi.

Tablo 3. 8 PZR uygulamasında kullanılan termal program

	Sıcaklık	Süre
	98 °C	2 dakika
6 döngü	98 °C	15 saniye
	64 °C	1 dakika
	10 °C	Bekleme noktası

Termalden sonra ürünler -20°C'de uzun süre beklenebilir. Termalden alınan ürünler tekrar alkol pürifikasyonuna alındı. Bu aşamada Agencourt® AMPure® XP Reagent ve taze hazırlanmış % 75'lik etanol kullanıldı. AMPure XP Reagent oda sıcaklığına getirildi. Beadler iyice vortexlendi ve tamamen dağılana kadar yavaşça pipetaj yaparak kullanıldı. Her bir örnek PZR plate içine alınmış ürünlerin üzerine toplam 25 µl Agencourt® AMPure® XP Reagent eklendi (0,5 katı olacak şekilde). Plate 10-15 saniye 1000-1500 rpm arasında vorteklendikten sonra hafif spin atıldı. Plate oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda plate manyetik standı alınarak karışımın tamamen temizlenmesi beklendi. 8 kanallı mikropipet kullanılarak pellete zarar vermeden supernatantlar atıldı. Eğer pipetleme esnasında kahverengi beadlerin de çekildiği görülürse hacim geri bırakılır tekrar temizlenene kadar beklenir ve pipetleme yapılır. 100 µl taze %70'lik etanol eklendi (beadlerin üzerinin kapanması yeterlidir). Manyetik stand üzerinde yıkama yapıldı. Beadler tamamen kuyucuk çeperlerine yapıştıktan sonra pellete zarar vermeden supernatantlar atıldı. Bu pürifikasyon adımları 2 kere tekrar edildi. Son kalan damlacıkları 1-10 µl'lik 8 kanallı mikropipet ile alınarak 3 dakika oda sıcaklığında iyice kurumaması beklendi. Manyetik stand üzerinde kuyucuklardaki beadlerin üzerine 50µl Low TE tek tek dağıtıldı. Plate iyice vortekslenene beadle ile Low TE'nin karışması sağlandı ve hafif bir spin atıldı. Manyetik stand üzerinde iyice temizlenene kadar beklendikten sonra dikkatlice

supernatant kısım alınarak Qubit ölçümü yapılarak emülsiyon PZR aşamasına geçildi.

3.2.3.5 One Touch 2 Cihazında Template Hazırlanması (Emülsiyon PZR)

Qubit ile ölçülmüş kütüphane ürünleri birleştirilerek 20 ng/ μ l oranında dilüe edildi. Emülsiyon PZR için gerekli olan reaktifler ile aşağıdaki tablodaki hacimler olacak şekilde birleştirildi.

Tablo 3. 9 Emülsiyon PZR bileşenleri

İçerik	Hacim
Template OT2 200 Reagent mix	800 μ l
Template OT2 200 Enzyme mix	50 μ l
Nuclease Free su	25 μ l
Diluted library	25 μ l
Toplam	900 μ l

Reaktifler 1,5ml LoBind Eppendorf tüpte veya 1,5 ml.lik ependorfta karıştırılıp vortekslenildi. Ion Sphere Particles oda sıcaklığına getirilir ve vortexlenip hemen kullanıldı. 100 μ l Ion Sphere Particles hazırlanan 900 μ l'lik karışıma eklenerek vortex yapıldı. Bu aşamadan sonar 15 dakika içinde One Touch 2 cihazına karışım eklenmesi gerekmektedir.

3.2.3.6 OT2 Cihazındaki Hazırlıklar

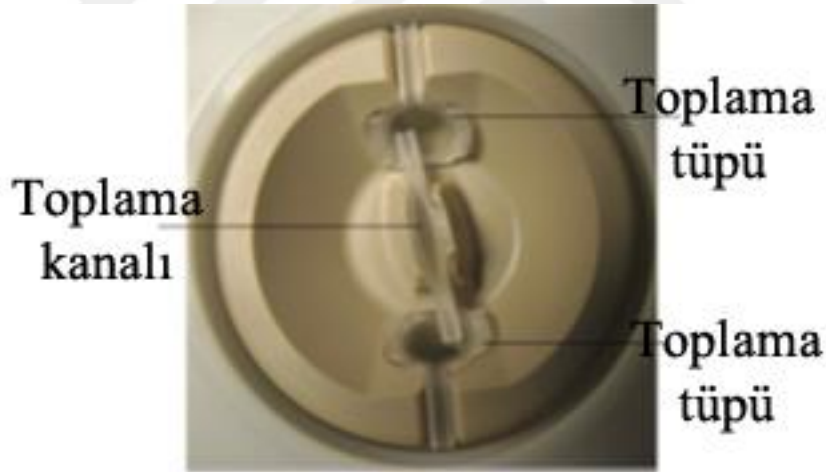
Cleaning adaptörü takıldı. Daha önceden yapılan Run'dan kalma, adaptör girişlerinde yağ birikintileri çekilerek temizlendi.



Şekil 3. 1 One Touch (OT2) cihazının görünümü

Oil ve Recovery solutions tüpleri (Orta cihazda bulunan 50 ml'lik tüpler) soldaki şişeye OT2 Oil yarı yarıya, sağdaki şişeye OT2 Recovery Solution çeyreği kadar dolduruldu ve kalem ile yükseklikleri belirlendi. Amplification Plate yerleştirildi ve Plate yerleştirilirken "İon" yazısı kullanıcıya bakacak şekilde konulmasına dikkat edildi. Daha önce kullanılmış olan veya Run sonrası cihazda bulunan plate yıkama için kullanılabilir. Amplification Plate'inin iğne ucu bir falcona yerleştirilir. Toplama tüpleri ve adaptörü yerleştirilmez. Cihaz üzerinde 'Clean' tuşuna basılarak yıkama başlatıldı. Bu işlem yaklaşık olarak 13 dakika sürer.

Sağ tarafta bulunan ekran üzerinden lid kısmı açıldı. Temiz toplama tüpleri kuyulara yerleştirildi (Kulakçıkları arkaya bakacak şekilde). Toplama tüplerinin üzeri 100 μ l'ye kadar çizildi (OT2 çalışma sonrası, her 2 toplama tüpü ağzına kadar dolar. İşaretlenen yere kadar 100 μ l kalacak şekilde üst kısım atılır). Toplama tüplerine 150 μ l Ion Breaking Solution eklendi. Ion S5 Hi-Q OT2 solutions solüsyonu dikkatlice koyuldu. Ortadaki kuyuya Recovery Router yerleştirildi.

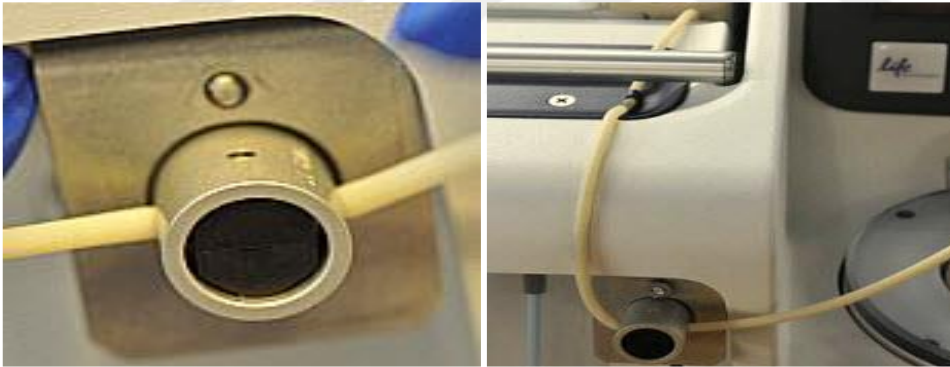


Şekil 3. 2 Emülsiyon PZR yapıldıktan sonra ürünlerin toplandığı tüpler

Amplification plate takıldı. Plate yerleştirilirken "İon" yazısı kullanıcıya bakacak şekilde plate'nin çıkış ince borusu OT2'nin en soldaki kuyucuğuna tam yerleşecek şekilde yerleşim sağlandı.

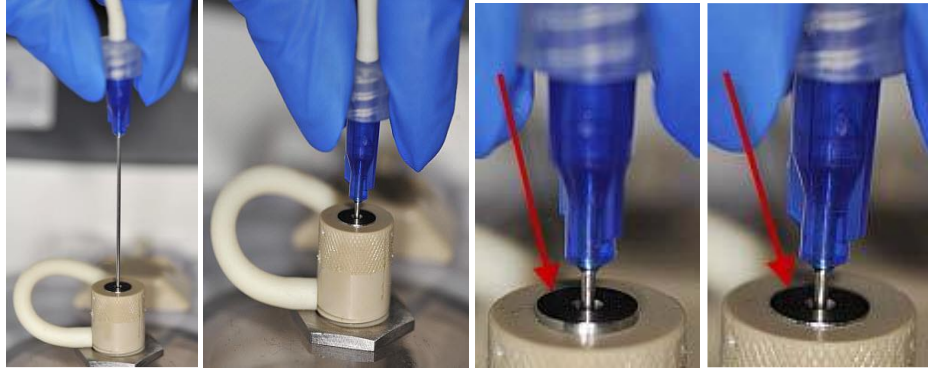


Şekil 3. 3 OT2 cihazının kritik parçaları



Şekil 3. 4 OT2 cihazının emülsiyon PZR'de yağ taşıma üniteleri

Plate iğnesi Lid üzerinde bulunan ince delikten klik sesi gelene kadar dikey konumda aşağıya kadar itildi. İğnenin eğilmemesi ve çok fazla itilmemesine dikkat edilir.



Şekil 3. 5 OT2 cihazının ürün taşıma iğnesi

Cihazın önünde soldaki şişeye OT2 Oil yarı yarıya, sağdaki şişeye OT2 Recovery Solution çeyreği kadar doldurulur ve hizası kalemle çizildi. Cleaning sonrası tüpler işaretli yere kadar dolduruldu. Filtre delikleri yukarı bakacak şekilde falkon standı üzerinde sağlam bir şekilde oturtuldu. Örnek portu (tekli ayrı duran delik) kısmından hazırlanan 1000 μ l amplification mix (ISPs) çok yavaş bir şekilde bırakıldı.



Şekil 3. 6 Emülsiyon PZR için kütüphane ve yağ moleküllerinin birleştirildiği port

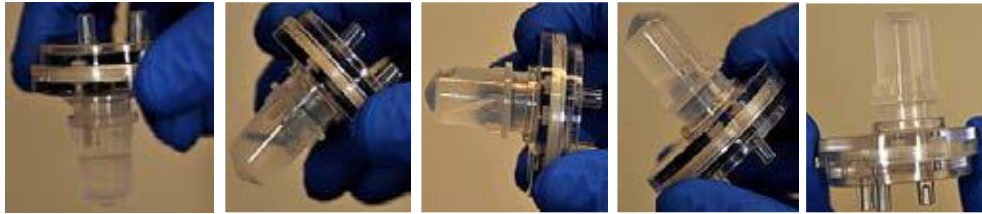
Pipetleme sırasında sabit akım sorunu olmaması için 1000l μ 'ik pipetin üst ayar vidası kademe kademe düşürülerek daha hassas ve güvenilir bir damlatım sağlanabilir. Pipet ucunun port'a sıkıca oturduğundan emin olunur.



Şekil 3. 7 Porta örnek ve yağ yükleme aşaması

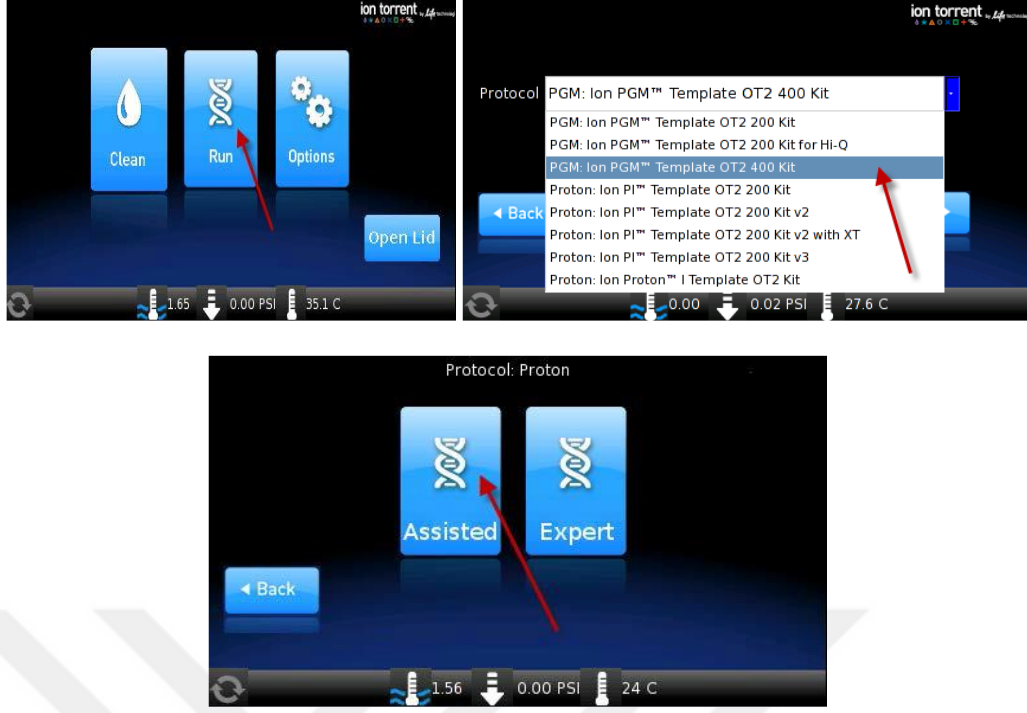
Ion One Touch Reaction Oil (+25 °C OT2 Template Kit) 1700 μ l aynı şekilde aynı delikten 2 seferde yüklendi (850 μ l +850 μ l). Reaction Oil eklenirken çok yavaş ve sabit bir damlatım sağlanmalı, filtre içindeki reaksiyon mixi ile faz oluşturacak ama karışmayacak şekilde bir hız uygulanmalı.

Örnek portu solda yukarı konumda kalacak şekilde tutulur. Dikey konumda yavaş yavaş saat yönüne doğru çevirerek sample port'u sağda aşağı konumda kalacak şekilde bırakılır. Böylece filtre ters dönmüş olacaktır (Şekil 3.8).



Şekil 3. 8 Porta eklenen yağ ve örneklerin ters-düz edilmesi

Filtredeki 3 delik OT2 cihazındaki 3 girintiye uygun şekilde oturtuldu ve yürütme verildi. Tüm komponentlerin yerlerine uygun şekilde oturtulduğu kontrol edildikten sonra OT2 üzerinde **RUN** sekmesi tıklandı. Çıkan ekranda uygun olan protocol seçildi.



Şekil 3. 9 OT2 cihazının arayüz programından bir görüntü

Yürütme bitiminde cihaz üzerinde örnek, tüp içerisinde son döndürme yapıldı. Bunun için RUN bitiminde NEXT ibaresi tıklandı ve cihazın 10 dakika daha dönmesi sağlandı.

Toplama tüplerinde 100 μ l kalacak şekilde pipet yardımıyla üst sıvı pellete zarar verilmeden uzaklaştırıldı. Bu işlem önce 1000 μ l'lik pipet yardımıyla sonrasında ise 100 μ l'lik pipet yardımıyla 2 seferde yapıldı. 100 μ l bırakılabilmesi için daha önce kullanılmış boş bir toplama tüpü referans olarak kullanılabilir.



Şekil 3. 10 Emülsiyon PZR sonrası ürünlerin toplanması

Her iki toplama tüpünün dibinde kalan bu 100 μ l ISPs aynı 100lük pipet ucu kullanılarak iyice pipetajlandı ve pelletin sıvı içinde tekrardan çözünmesi sağlandı. Her iki toplama tüpü içindeki pipetajlanmış sıvılar tek bir tüpte birleştirildi. Eğer birleştirme sonrası total hacim 100 μ l'den daha az ise Ion One Touch Wash Solution ile tamamlandı.

3.2.3.7 ION OT2 Enrichment System Cihazına Yükleme

Emülsiyon PZR sonunda elde edilen ürün dizilenme esnasında daha pürifiye olması için saflaştırılma aşamasına geçildi. Tabloda gösterildiği gibi Melt-Off solüsyonu hazırlandı.

Tablo 3. 10 Kütüphane ürünlerini zenginleştirme reaktifleri

İçerik	Hacim
Tween Solution	280 μ l
1M NaOH	40 μ l
Toplam	320 μ l

13 μ l DynaBeads MyOne Streptavidin C1 Beads, LoBind eppendorf tüpe veya 1,5 ml Eppendorf tüpüne koyuldu ve manyetik stand üzerinde tamamen temizlenene kadar bekletildi. Temizlenen karışımdaki supernatant alınıp atıldı. Pellet üzerine 130 μ l MyOne Beads Wash solüsyonu eklenerek yıkama yapıldı ve iyice vorteksenerek kullanıma hazır hale getirildi.



Şekil 3. 11 Zenginleştirme kuyucuklarının şeması

8'li kuyucuklara önceden hazırlanan örnekler, melt-off ve yıkanmış beadler koyuldu. Sırası ile 100 μ l örnek, 130 μ l DynaBeads MyOne Streptavidin C1 Beads, Ion One Touch Wash solüsyonu, Ion One Touch Wash solüsyonu, Ion One Touch Wash solüsyonu, boş, melt-off solüsyonu ve boş olmak üzere içerikler koyuldu.



Şekil 3. 12 Zenginleştirme cihazının kuyucukları

Zenginleştirme cihazında pipetleme koluna, pipet ucu sıkıca takılıp cihaza yürütme verildi. Yaklaşık olarak işlem 35 dakika sürdü.

3.2.3.8 Dizileme İçin ÇİP yükleme

Zenginleştirme aşamasından alınan örnekler çok zaman kaybetmeden Ion GeneStudio™ S5 Plus System cihazında dizileme için çip yüklemesine geçilmesi gerekmektedir.



Şekil 3. 13 Ion GeneStudio S5 Plus cihazının görünümü

Örneklerin miktarına göre (örnek sayısı, bakılan gen miktarı ve genlerin ekzon miktarı) farklı çipler kullanılabilir.



Şekil 3. 14 S5 Plus cihazında kullanılan çipler

0,2 μ l'lik tüpe aktarılmış olan örnekler alındı. Ion Chip™ üzerine örnek 100 μ l'lik piper yardımı ile port deliğinden yavaşça bırakılarak kuyucuklara gitmesi sağlandı.



Şekil 3. 15 Örneklerin cihazda okutulması için çipe yüklenmesi

Çip yüklenmesi tamamlandıktan sonra dizileme için cihaza yerleştirildi.

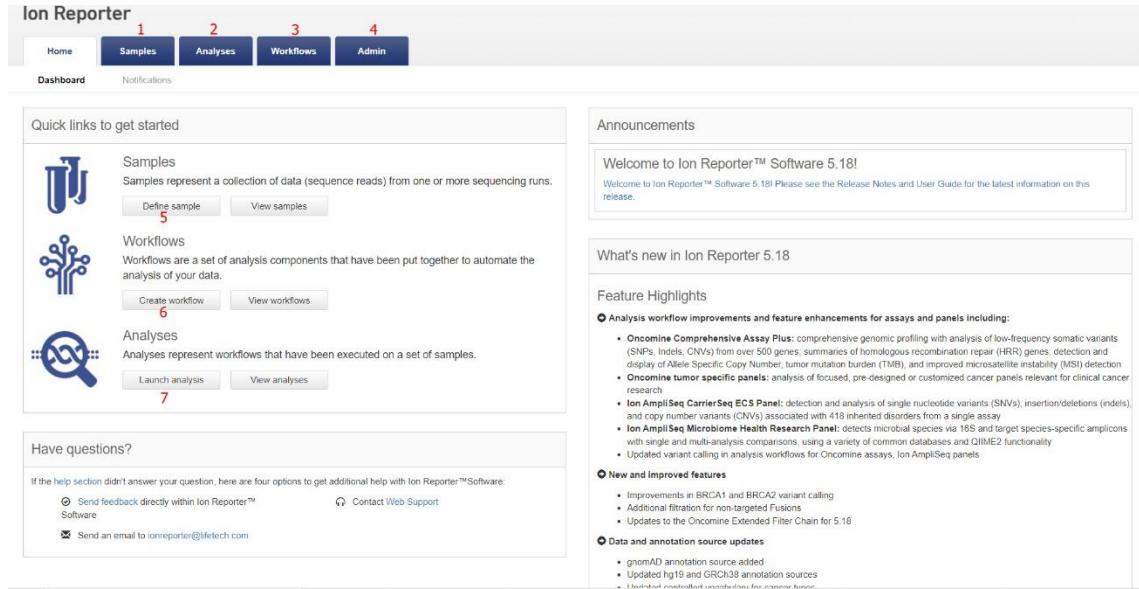
3.2.3.9 Yeni Nesil Dataların Analizi

GeneStudio™ S5 Plus System çıkan datalar Ion Reporter™ 5.14 web tabanlı arayüz yazılım programında varyasyonlar analiz edilmiştir.

Ion Reporter™ yazılımı, Ion Torrent™ yarı iletken dizi (hidrojen iyonu değişimi okuması) dataların analizini, açıklamasını ve raporlanmasını kolaylaştıran bir biyoinformatik paketidir. Ion Reporter™ Yazılımı, Torrent Suite™ yazılımından çıkan BAM dosyaları üzerinde analiz gerçekleştirir. VaryantCaller eklentisinin kullanılabilir olmasından dolayı VCF çıktı dosyaları da Ion Reporter™ yazılımı ile

analiz edilmek için kullanılabilir. Binary Alignment Map (BAM) veya Variant Call Format (VCF) dosyasını manuel olarak da yüklenmektedir.

Arayüz programı fotoğraf şekil 3.16'da görüldüğü gibi aktif kullanılan 4 tane sekmesi bulunmaktadır.



Şekil 3. 16 Analiz programının arayüzü

1. Eklenmiş örneklerin listelendiği sekme.
2. Eklenmiş örneklerin analizlere ulaşıldığı sekme,
3. Oluşturulmuş iş akışlarının listelendiği sekme.
4. Arayüz programının kullanıcı ayarlarının olduğu sekme.
5. BAM dosya uzantılı yeni örneklerin eklendiği sekme.
6. Yeni bir iş akışının oluşturulduğu sekme.
7. Yeni bir analiz başlamak için kullanılan sekme.

Veriler programa aktarıldıktan sonra, yazılım arayüzünde istenilen listeler kolayca özelleştirebilir. Örneğin, yalnızca araştırmanızla ilgili verileri içeren bir analiz sonuçları tablosunu görüntüleyebilir ve veri sütunlarının düzenlendiği sırayı değiştirmek için sütunları sürükleyip bırakabilirsiniz.

Örnekler arayüz programında analiz edildikten sonra yukarıdaki resimde görülen 2 numaralı sekmeden analiz edilmiş örneklere ulaşılır. Bu kısımda analiz edilmiş varyasyonlar sıralanmış şekilde kullanıcıya sunulur.

Analysis Results

Analysis Name: 2020_5525_ALPORT_v1_c3754_2020-04-16-12...

18

My Variants Download Visualize Selected Variants Send to Report Role Switch To Generate Report

To learn more about reviewing your results, visit the help guide.

Summary Functional Population Ontologies Pharmacogenomics QC

Search Go Preferences

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Classification	Locus	Ref	Type	Allele C.	Coding	Amino Acid Change	ClinVar	dbSNP	Exon	Gene	Transcript	Allele Ratio	No Call	% Frequency	
	Unclassified	chr2:228194769	C	SNV	C>257, T=254	c.145-99C>T	p.?		r17579991		COL4A3 (2)	NM_000991.4, NR_102371.1	C=0.5029, T=0.4971		49.71	
	Unclassified	chr2:228196624	GTT	INDEL	GTT+63, GTT+122, GTT+69	c.289-41_289-40insG, c.289-42delT	p.T, p.?		r115428534 (5)		COL4A3 (2)	NM_000991.4, NM_000991.4, NR_102371.1	GTT=0.248, GTT+0.4803, GT=0.2717		48.03	
	Unclassified	chr2:228199784	C	SNV	C>187, T=193	c.324+73C>T	p.?		r1330756089 (2)		COL4A3 (2)	NM_000991.4, NR_102371.1	C=0.55, T=0.45		45.00	
	Unclassified	chr2:22811435	T	SNV	T>308, C=308	c.422T>C	p.Leu141Pro	Benign	r181778458	7	COL4A3 (2)	NM_000991.4, NR_102371.1	T=0.4992, C=0.5008		50.08	
	Unclassified	chr2:22811690	G	SNV	G>311, T=314	c.441+146G>T	p.?		r19158566		COL4A3 (2)	NM_000991.4, NR_102371.1	G=0.4975, T=0.5024		50.24	
	Unclassified	chr2:22811604	G	SNV	G>310, T=314	c.441+150G>T	p.?		r19188587		COL4A3 (2)	NM_000991.4, NR_102371.1	G=0.4888, T=0.5032		50.32	
	Unclassified	chr2:22812186	A	SNV	A>9, G=48	c.442-85A>G	p.?		r14321358		COL4A3 (2)	NM_000991.4, NR_102371.1	A=0.0, G=1.0		100.00	
	Unclassified	chr2:22813175	A	SNV	A>213, G=238	c.485A>G	p.Glu182Gly	Benign	r16439669	9	COL4A3 (2)	NM_000991.4, NR_102371.1	A=0.4723, G=0.5277		52.77	
	Unclassified	chr2:228118403	T	SNV	T=0, G=604	c.785+49T>G	p.?		r13229551 (2)		COL4A3 (2)	NM_000991.4, NR_102371.1	T=0.0, G=1.0		100.00	
	Unclassified	chr2:228121191	G	SNV	G>258, T=201	c.975G>T	p.Asp229Tyr	Benign/Likely benign	r55793767	17	COL4A3 (2)	NM_000991.4, NR_102371.1	G=0.4615, T=0.5385		53.85	

Şekil 3. 17 Analiz edilmiş varyasyonların kullanıcıya değerlendirmesi için sunulması

1. Yüklenen örneklerin doğru şekilde kayıt edilmesi için etiketleme önemlidir. Bu kısımda örneğin etiketi kullanıcıya sunulur.
2. Kullanıcı için varyasyonların önemli ya da önemsiz olmasına göre işaretleme yapılabilen alan
3. Tespit edilen varyasyonun önemi spesifik olarak belirten kısım.
4. Tespit edilen varyasyonun kromozom üzerindeki referans genoma göre lokusu.
5. Varyasyonun tespit edildiği noktadaki referans dizideki nükleotit karşılığı.
6. Tespit edilen varyasyonun çeşidi.
7. Tespit edilen varyasyonunu referans ve alternative okuma sayısı
8. Tespit edilen varyasyonun ORF içinde bulunan protein ifadesi olan ekzon isinlendirmesi.
9. Tespit edilen varyasyonun ekzon içinde sebep olduğu protein değişimi.
10. ClinVar veritabanında eklenmiş olan varyasyonun kriterlerinin belirtildiği sütun.
11. Tek nükleotit değişim vary tabanlarındaki varyasyonun ID numarası.
12. Tespit edilen varyasyonunu hangi ekzon içinde olduğunu gösteren sütun.
13. Tespit edilen varyasyonun hangi gende olduğunu gösteren sütun.
14. Tespit edilen varyasyonun isimlendirildiği transkript numarası.
15. Tespit edilen varyasyonun alel oranı.
16. Anutasyon sonrası kapsam dışı kalan varyasyonun neden kapsam dışı kaldığının açıklandığı sütun.

17. Tespit edilen varyasyonun alel frekansı. Varyasyonun homozigot, hemizigot veya heterozigot kalıtıldığıının belirlendiği sütun.

Ion Reporter™ ara yüz programına yüklenmiş BAM dosyalarından ara yüz programı yukarıdaki şekil 3.17’de gösterildiği gibi varyasyonların listelerini verir. Tespit edilen varyasyonlar *in silico* algoritmalar (Human Splice Finder, PolyPhen-2, SIFT/Provean ve MutationTaster) uygulanarak, tahminsel patojenite değerlendirilmesi yapılır. Bu algoritmalara ulaşmak için www.varsome.com veya <https://franklin.genoox.com/clinical-db/home> veri bankaları aracılığı ile lokus numarası ve nükleotid değişimleri yazılarak American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) kriterleri göz önünde bulundurularak varyasyonun patojenitesi hakkında bilgilendirme alınır. Bu bilgilendirme kliniğe etkisi hakkında yorum yapılabilir. Varyasyonun patojenitesi etkileyen çok fazla kriter mevcuttur.

Tablo 3. 11 Analiz edilen varyasyonların ACMG kriterlerine göre patojenite skalası

Patojeniteyi Arttıran Kriterler	
PP1	Ailedeki diğer hasta bireylerin varyasyonu taşıması
PVS1	Sıfır varyant (nonsense, frameshift, splice bölgesi, başlangıç kodonu, tekli veya çoklu ekzon delesyonu)
PS1	Daha önce patojenik olduğu belirlenen varyantla nükleotid değişiminden bağımsız olarak aynı amino asit değişimi
PS2	Hastada bulunup aile geçmişinde bulunmayan de novo varyantı. (Gen fenotip ile ilişkili olmalıdır.)
PS3	In vitro veya in vivo çalışmaları fonksiyona zarar verici etkiyi işaret ediyor
PS4	Varyantın hasta kişilerde görülme sıklığı sağlıklı kişilere göre çok daha fazla

PM1	Benin varyasyonların görülmediği mutasyon yoğun bölgelerde yer alması
PM2	Düşük alel frekansı (Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, ya da Exome Aggregation Consortium)
PM3	Patojenik başka bir varyantla trans halinde bulunması (çekinik hastalıklar için)
PM4	Varyant sonucu protein uzunluğunun değişimi
PM5	Daha önce patojenik olduğu belirlenen bir missense varyasyonun olduğu amino asitte olan yeni bir missense varyant
PM6	De Novo varyasyon (ebeveny bilgisi olmadan)
PP2	Benin varyasyon görülme sıklığının az olduğu bir gende görülen missense variant
PP3	Biyoformatik algoritmaları tarafından patojenik sınıflandırması (SIFT, PolyPhen, MutationTaster)
PP4	Hastalığa özel aile fenotipi
PP5	Güvenilir kaynaklar tarafından patojenik olarak sınıflandırılan varyant (clinvar)
Patojeniteyi Düşüren Kriterler	
BA1	Çok yüksek alel frekansı (Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, ya da Exome Aggregation Consortium)
BS1	Hastalık için öngörülenden yüksek alel frekansı
BS2	Erken yaşta etki eden hastalık için yetişkin bir bireyde görülmesi

BS3	In vitro veya in vivo çalışmaları fonksiyona zararsız etkiyi işaret ediyor
BS4	Diğer hasta aile bireylerinde görülmemesi
BP1	Kırpma (Truncating) varyasyonların sebep olduğu bilinen bir hastalıkta missense variant
BP2	Tamamen penetran, dominant bir gen/hastalık için Patojenik başka bir varyantla trans halinde ya da herhangi bir kalıtım modelinde Patojenik başka bir varyantla cis halinde gözlemlenmesi
BP3	Tekrarlayan bir bölgede çerçeve içi delesyon/insersiyon
BP4	Biyoenformatik algoritmaları tarafından benin sınıflandırması (SIFT, PolyPhen, MutationTaster)
BP5	Varyantın hastalık için alternatif moleküler temelde bulunduğu durum
BP6	Güvenilir kaynaklar tarafından benin olarak sınıflandırılan varyant (clinvar)
BP7	Splicing üzerinde etkisi olmayan benin varyant

Örnek olarak chrX:107935976 lokusunda bulunan NM_033380.3 transkript konsensus numaralı COL4A5 geninde tespit edilen c.4529-2A>G varyasyonu *in silico* araçlarına göre protein defektine sebep olduğu düşünülmektedir. Protein katlanması etkilediğini ve görevini ifa edememesinden dolayı işlevsiz proteine sebep olduğu düşünülmektedir. Laboratuvar çalışmalarında ve popülasyon frekanslarında hiç görülmeyen bu varyasyon klinik olarak etkili olacağı düşünülebilir.

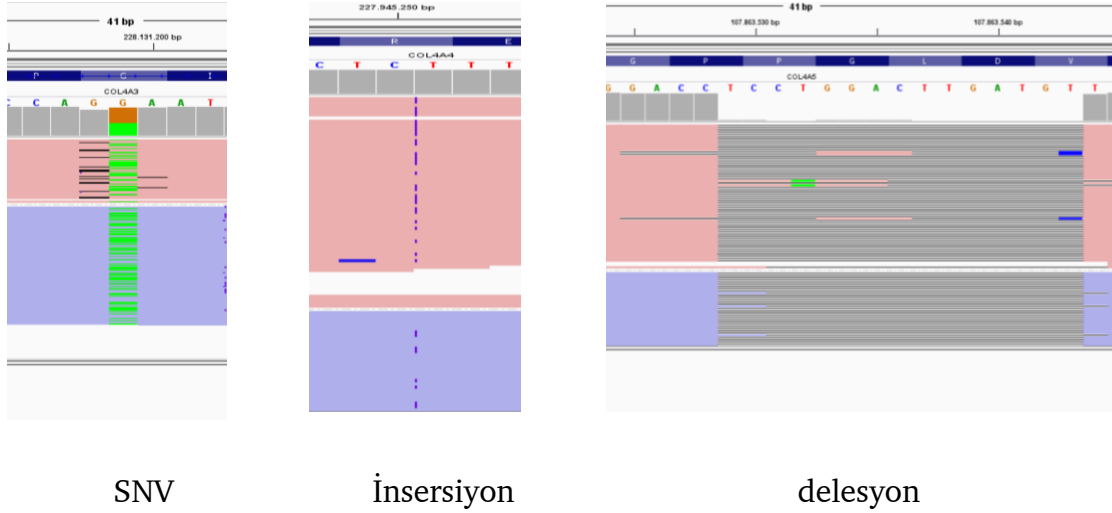
chr2:228131199 lokusunda bulunan NM_000091.5 transkript konsensus numaralı COL4A3 geninde tespit edilen c.1382G>A varyasyonu 461. Kodondaki

Glisin amino asidini Glutamat'a dönüştürmektedir. Bu amino asit değişim proteinin fonksiyonel bölgesinde bulunmasından dolayı protein katlanmasında ve işleyişinde etkili olmaktadır. Ayrıca varyasyon popülasyon frekanslarında hiç görülmemiş olup aynı bölgede G>C dönüşümü laboratuvar çalışmalarında hastalıkla ilişkili olduğu görülmüştür. Bu kriterler sonucunda bu varyasyon klinik olarak etkili olacağı düşünülebilir.

The screenshot displays the VarSome website interface for a variant analysis. The variant is identified as chrX-107935976-A-G. The variant type is SNV, and the gene is COL4A5. The variant is classified as Pathogenic. The interface includes a search bar, navigation menu, and a detailed view of the variant with various criteria and evidence. The variant is classified as Pathogenic. The interface includes a search bar, navigation menu, and a detailed view of the variant with various criteria and evidence.

Şekil 3. 18 Bir varyasyon açısından veri tabanı bilgileri

Analiz sonuçları sonucun tespit edilen varyasyonların görselleştirmeleri, belirlenen bir tercihe bağlı olarak, Ion Reporter™ Genomik Görüntüleyici (IRGV) veya IGV yazılımları ile görselleştirilebilir. Görselleştirme işlemi tek nükleotid değişimi (SNV) okumaların yüksek olduğu zamanlarda birşey ifade etmemektedir. Fakat delesyon ve insersiyon değişimlerinde görselleştirme özellikle varyasyonun göz confirmasyonu açısından önem arz etmektedir.



Şekil 3. 19 3 farklı varyasyon tipinin IGV görüntüsü

3.2.4 Yeni Varyasyonların Konfirmasyonu (Sanger Dizileme)

Tespit edilen yeni varyasyonlar klasik Sanger metodu ile doğrulandı.

3.2.4.1 Sanger PZR Hazırlık

Sanger dizileme için primerlerin tasarlamasında dbSNP veri tabanında daha önceden saptanmış SNP'lerin olmamasına, tekrarlayan dizi içermemesine, forward ve reverse primerlerin bağlanma ısıları birbirlerine yakın olmasına, purin ve pirimidin sayılarının primer içinde eşit dağılımına ve boyut olarak 17 nükleotid'den az ve 24 nükleotid'den fazla olmamasına dikkat edildi. Tasarlanan primerlerin gen bölgesinde beklenen varyantları analiz edilmesine ve varyantların bulunduğu bölgelerin en az 20-30 bazlık uzunlukta dışarıdan kapsayacak şekilde ticari olarak faaliyet gösteren bir firmada tablo 3.12'de gösterildiği gibi sentezletildi.

Tablo 3. 12 COL4A3, COL4A4 ve COL4A5 genlerine ait primer dizileri

COL4A3		COL4A4		COL4A5	
Exon	Primer çifti dizisi	Exon	Primer çifti dizisi	Exon	Primer çifti dizisi
Exon 6	GTTTCAGTGTGTTTCTTGGG CTGCCTTTTCATTGCCATTTTC	Exon 9	GCAGTTAGATGAGTCCAGATAATTTTG TATGTAGCTGGCTTTGCTGG	Exon 3	AATCTCAACCATGCCTGTGC TGACACCTAGTCCCACATTTAAG
Exon 21	TGGTTATTTAACAAGGCCACAG GCACACATCTGTCAATTTGGC	Exon 24	TCTCTATCTACTTTACCCTCTGC GAGAAAGGGGAAATAGTTGTTTG	Exon 14-16	AGCTCTAGTGCTTAGAATGAAAATG GCTTCTGCCACCTTATGTTATAC
Exon 22	GGCTTCCAATACAAGATGAGAG GGATCATTGTTATCTCAGGGG	Exon 28	TCTCTACAAAAGGTGGCAAAC CCCCAATGAGGGAAAACAC	Exon 21	TCTGGCTTGTCAAGGCTTTC GGGAGTCAAGTGGCTAAGGTG
Exon 26	TGGAGGATGATTAACCTGTG AGAAACCATCAACCCACTCC	Exon 31	TGAGACTCTGCCACCTCCC CAGAGATCACATTTCTAGGTTTGG	Exon 30	CCAAGGACTAGTACTCAGGTG TTGTAGGTTTCACITTTATTGATGAGC
Exon 30	TCAATATCAGTGAAGATTTGGAAG GCCTAGAACACCTTCACATTCAG	Exon 32	GAATTTGCGATTTGGGAGTG CAGTGTATTGGGGAAAGTTGC	Exon 31	TCTTAGTCTGTATCTACAGGGTTC TGGGAATTATCTACCAGAGTCCG
Exon 31	CCAATGTTCTGCCCTACC GTCAGGACTTGTGGCTGGAC			Exon 32	ACAGTGCCTTACGTCCAACC AGAAACACAAGTAACCATTTGCTC
Exon 40-4	AATCCACACATCTCCCTGG CACAGTTTCTAATTCATTCATTTG			Exon 44	GATGACTGATATTTTAAAAGCCTGAC TGTTAATTAAGATGATGACGCTTAG
Exon 44	CTTCAGCTTATTCTCAACCAAC TTGTACTAACCAGCTGTCTG			Exon 50	CTGTTTGTCTATTGTTTTAGAAGAAAC CAAATCTGACTAGCTAACTAAGTGGG
Exon 48	GCTTCAATTTATGGGCTCAAC AAAGATTTACAATCTGCATGTGG			Exon 51	CTTCAATGAAGCAGGATGG TGATAGTGAATGGACAGTCAAG
Exon 52	TTATCCTCCACCTCAGCC AATTGCTTTGTTTGTGGG			Exon 53	GAAAAGTAAACATTAGTCAACCAAG TTGGGGACAATGAGACACTG

Yeni tespit edilen varyasyonları görecekte şekilde liyofilize olarak yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC) saflığında sentezlenmiş primerlerden stok çözelti hazırlandı. TE ile sulandırılan primerler 100 µM konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı. Stok çözeltisinden 5 µM olarak hazırlanan primerler kullanılmak üzere -20 °C de buzdolabında bekletildi. Bu primerler kullanılarak tabloda gösterildiği şekilde her bir örnek için hazırlanan reaktifler ile PZR yapıldı.

Tablo 3. 13 Sanger dizileme için kullanılan reaktifler

İçerik	Hacim
dH ² O	9 µL
Dimetil sülfoksit (DMSO)	1,5 µL
PZR reaktifleri (dNTP, buffer, MgCl)	5,3 µL
Forward Primer	1,5 µL
Reverse Primer	1,5 µL
Taq Polimeraz (Thermo Scientific)	0,2 µL
DNA örneği (20-100 ng/µL)	2 µL
Toplam	20 µL

Hazırlanan DNA'larda hedef bölgenin çoğaltılması için PZR programı tabloda gösterildiği şekilde gibi uygulandı.

Tablo 3. 14 PZR için kullanılan termal program

	Sıcaklık	Süre
	95°C	10 dakika
35 Döngü	95°C	40 saniye
	*60°C	1 dakika
	72°C	1 dakika
	4°C	Bekleme noktası

*Primer çiftlerine göre sıcaklık değişiklik göstermektedir.

PZR ürünlerinden 3 µL, 8 µg/ml etidyum bromür içeren %1'lik agaroz (Sigma) ve SYBR™ Safe DNA (Thermo Fisher) ile boyanmış jelde, 120 Voltda, 30 dk yürütülüp ayrılması sağlandı. Daha sonra ultraviyole ışık altında iBright™ FL1500 cihazında bantların görüntüsü alındı.

3.2.4.2 Ürünlerin Pürifikasyonu

Elde edilen PZR ürünleri, dizileme yapılmadan önce ile saflaştırıldı. Bu saflaştırma enzimatik yöntemi kullanarak gerçekleştirildi. Saflaştırması Exonuclease-I (EXO Thermo Scientific) ve FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (SAP-Thermo Scientific) enzimleri ile stok çalışma solüsyonu hazırlandı (EXOSAP). 5µL örnek üzerine 2µL EXOSAP eklenerek termal döngü cihazında tablodaki şekilde uygulandı.

Tablo 3. 15 Enzimatik saflaştırma için kullanılan termal program

Sıcaklık	Süre
37°C	30 dakika
80°C	15 dakika
4°C	Bekleme noktası

3.2.4.3 Sanger BigDye Dizileme

Pürifikasyon sonrasında ürünler BigDye v3.1 ile boyanması için gerekli reaktifler ile tablodaki şekilde birleştirildi.

Tablo 3. 16 Dizileme için kullanılan reaktifler

İçerik	Hacim
dH ² O	4,8 μ L
5x BigDye Buffer	2 μ L
Primer (Forward ya da Reverse)	0,5 μ L
BigDye	1 μ L
Örnek	2 μ L
Toplam	10,3 μ L

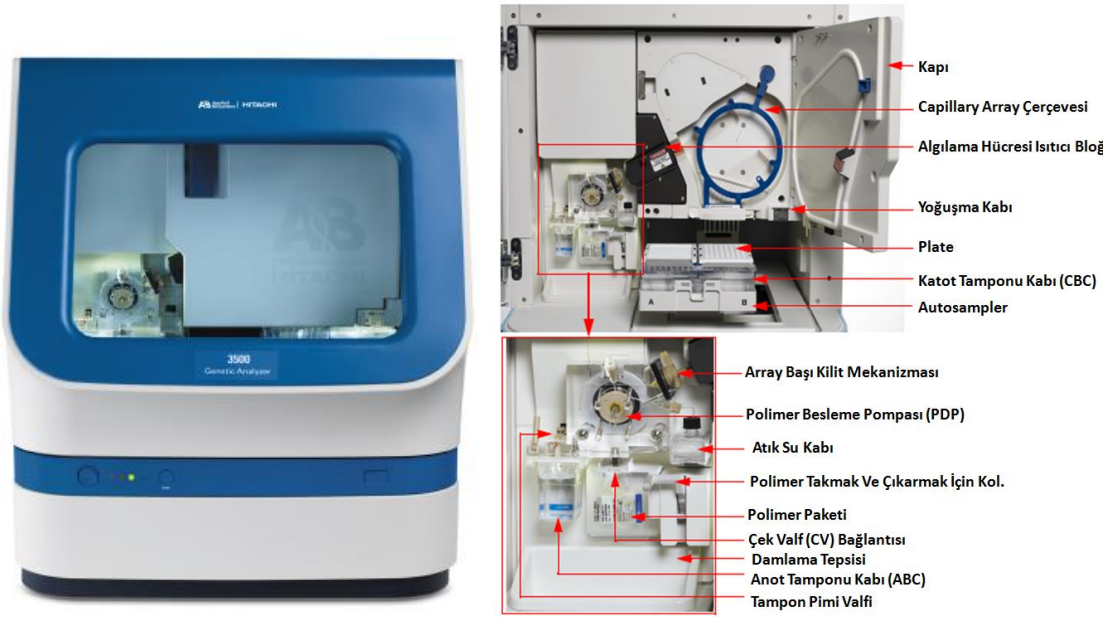
Her bir örnek üzerine karıştırılan reaktifler eklenerek tablodaki protokole göre termal döngü cihazında uygulandı.

Tablo 3. 17 Dizileme için kullanılan termal program

	Sıcaklık	Süre
	96°C	1 dakika
25 döngü	96°C	10 saniye
	50°C	5 saniye
	60°C	4 dakika
	4°C	Bekleme noktası

Dideoksinükleosit trifosfat (ddNTP) ile işaretlenmiş DNA dizi fragmanları, kullanılmayan ve okumaya etkisi olacak ortamda bulunan diğer kimyasalların uzaklaştırılması aşamasına geçildi. Bu aşamada alkol pürifikasyonu kullanıldı. 96 kuyuluk plate üzerinde her bir örnek üzerine 1µL %2'lik glikojen+1µL 3M sodium asetat +1µL 125mM EDTA+25µL %100 soğuk etanol eklendikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 15 dakikalık bekleme sonrası sonra 4000 rpM hızda 45 dakikalık santrifüj edildi. Daha sonra platein üzerindeki koruyucuyu alınıp ters çevrilerek yaklaşık olarak 900 rpM hızda 30 saniye santrifüj yapıldı. Santrifüj bittikten sonra kuyucuklara %70'lik etanoldan 35µL ilave edildip kapatıldıktan sonra 4000 rpM hızda 15 dakika kadar santrifüj edildi. Santrifüj bittikten sonra örnekler tekrar ters çevrilerek yaklaşık 900 rpM hızda 60 sn kadar santrifüj edildi. Ardından kuyucuklara 10µL HiDi formamid eklendi. Örnekler denatürasyon amaçlı 95 °C ısıda 3 dakika bekletildi. Sonrasında saflaştırılmış plate yürütme amacı ile Applied Biosystems™ Genetik Analizör 3500 cihazına yerleştirildi. İşlemden elde edilen FASTA dosyası bilgisayar ortamında analiz edildi. Bunun için ABI Sequencing Analysis v5.4 ve SeqScape v.4 (34) programları kullanıldı.

3.2.4.4 Applied Biosystem 3500 Genetik Analizör Cihazı

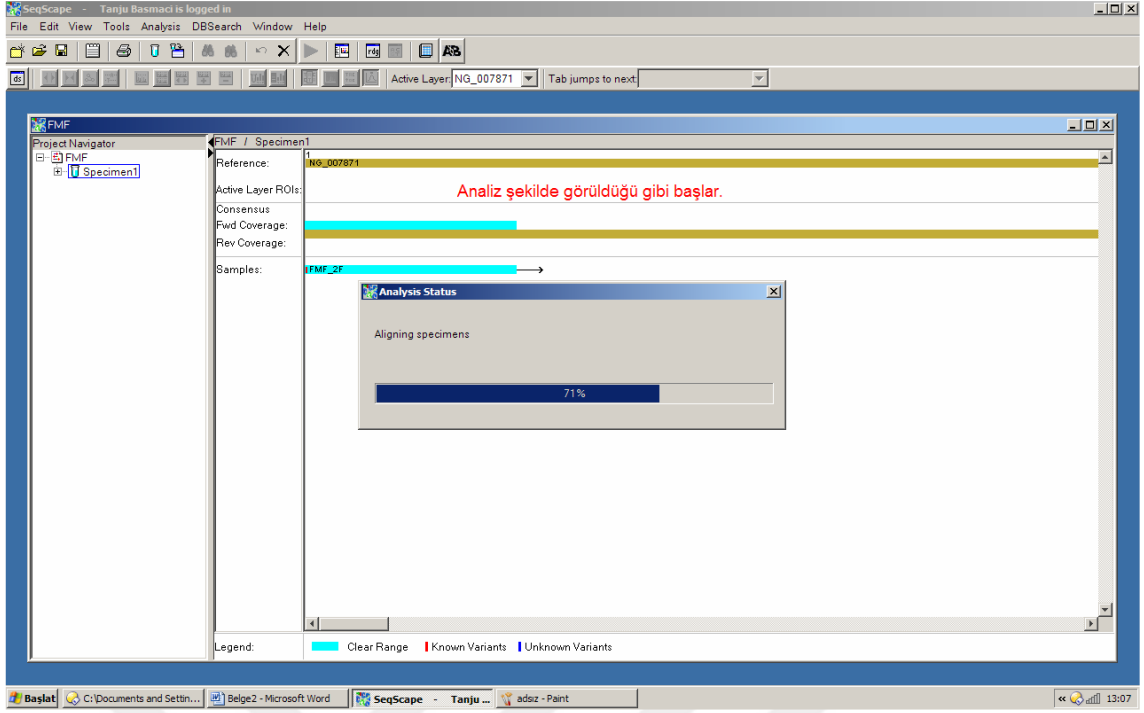


Şekil 3. 20 Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer cihazının iç ve dış görünümü

3500 Genetik Analizör, 8 veya 24 kapillerli kılcal elektroforez teknolojisi kullanan floresan bazlı DNA analiz cihazıdır. Dizileme için ddNTP ile işaretlenmiş ürünler POP-7 polimeri kullanılarak yürütüldü.

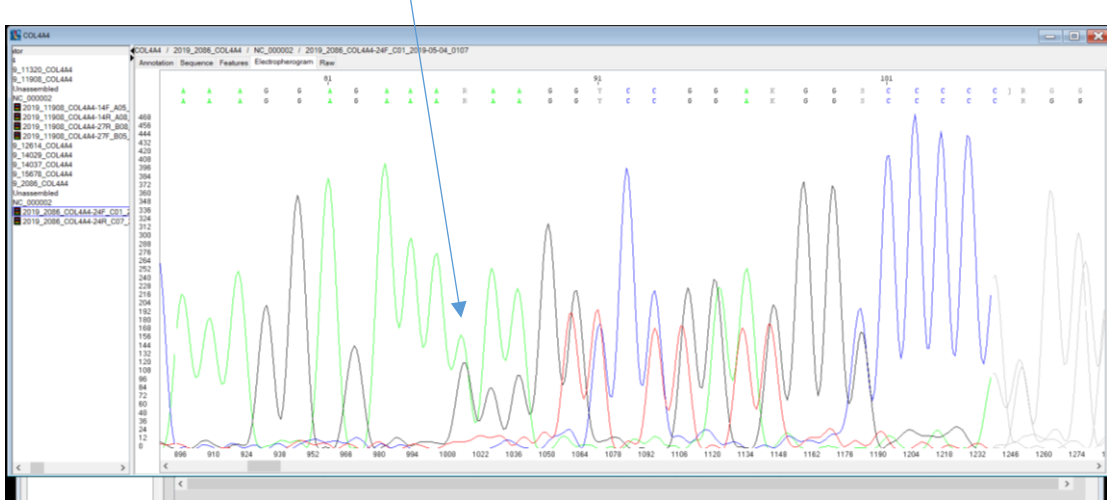
3.2.4.5 Sanger Dataların Analizi

SeqScape Programı kullanılarak herhangi Sanger dizileme sonucu elde edilen data analiz edilebilmektedir. Bunun için gerekli olan analiz edilecek genin referans dizisini programa tanıtmaktır. Program arayüzünde New Project Wizard sekmesinden .gb uzantılı referans dizi eklenir.

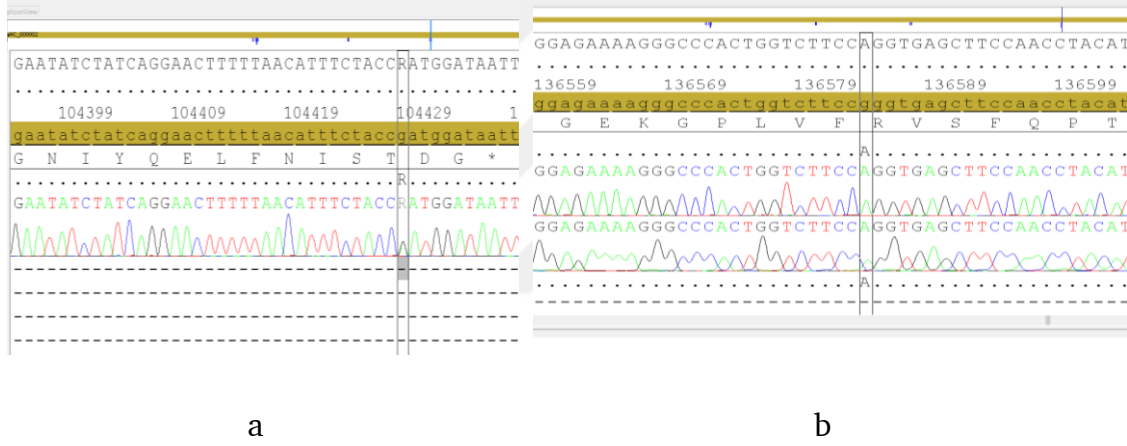


Şekil 3. 21 SeqScape programının arayüzü

İndel başlangıcı, çerçeve kayması



Şekil 3. 22 SeqScape programından indel varyasyon görüntüsü



Şekil 3. 23 SeqScape programından sırası ile a) heterozigot ve b) homozigot varyasyon görüntüsü

Referans dizi ile sangerlenmiş örnek program tarafından okunur. Farklı olan okumaları kullanıcıya sunarak değerlendirilmesi sağlanır.

4.1 Sonuç

2019-2021 Tarihleri arasında İstanbul Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi ve Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Genetik Hastalıkları Tanı Merkezine başvurmuş Alport Sendromu (AS) şüpheli 125 hasta ve klinik AS açısından hiçbir belirti göstermeyen 45 kontrol grubu birey çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca web tabanlı varyasyon analiz aracı olan “seq.genomize.com.tr” programındaki bireylerin varyasyon frekansı da eklenmiştir.

Elde edilen DNA’lar 10-110 ng/ μ L konsantrasyonları arasında elde edilmiştir. Yeni nesil dizileme için DNA’lar 5 ng/ μ L yoğunluğunda kullanılırken, Sanger dizileme için yüksek konsantrasyondaki DNA’lar 10-80 ng/ μ L yoğunluk aralığına dilüe edilerek kullanılmıştır.

Hastaların yaş ortalaması 23.05 ± 20 yıl (3-63 yaş) olarak hesaplanmıştır. Çalışmada yer alan hastaların 61’u (%48,8) kadın, 64’si (%51,2) erkek olup kadın/erkek oranı 0,95’dir.

Hastaların Tıbbi Genetik Kliniği’ne başvurularında 34’ünde (%27,2) mikroskobik veya makroskobik hematüri, 38’inde (%30,4) proteinüri, 5’inde (%4) hipertansiyon, 2’sinde (%1,6) görme kayıpları, 18’inde (%14,4) işitme kayıpları ve 45’inde (%36) böbrek ile ilişkili hastalıklar tespit edilmiştir.

Genetik olarak tanı koyulan hasta sayısı 27 (%21,6) olup VUS varyasyon tespit edilen hastalar eklendiğinde bu rakam 43 (%34,4)’e çıkmaktadır. Tanı konulan hastaların kalıtım şekillerine göre dağılımına bakıldığında; 12 hastanın (%44,4) X’e bağlı, 4 hastanın (%14,8) otozomal resesif, 11 hastanın (%40,7) otozomal dominant paternine sahip olduğu görülmüştür.

Genetik çalışma yapılmış hastaların yeni nesil dizileme analiz sonuçlarına göre hastalar *COL4A3* geninde 45, *COL4A4* geninde 37 ve *COL4A5* geninde 21 olmak

üzere toplam 103 varyasyon tespit edilmiştir. Tespit edilen varyasyonlar tablo 4.1, 4.2 ve 4.3'de verilmiştir.



Tablo 4. 1 Hastaların *COL4A3* (NM_000091.5) geninde tespit edilen varyasyonlar

Varyasyon	Protein değişimi	Variant Type	Hasta Frekansı	Kontrol Frekansı	Genomize Frekansı	dbSNP	ACMG Kriterleri
c.2T>C	p.Met1Thr	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs1553725815	pvs1.ps1.pm2.pp5(Patojenik)
c.127G>C	p.Gly43Arg	Yanlış anlamlı	0,425	0,2667	0,232	rs13424243	ba1.bs2.bp6(Benign)
c.144+12C>A	-----	İntronik	0,525	0	0,37	rs1882435	ba1.bs2.bp6.bp7(Benign)
c.145-21 delA	-----	İntronik delesyon	0,0083	0	0	rs1169972007	pm2.bp7(VUS)
c.222G>T	p.Pro74=	Sessiz	0,0417	0	0	rs187950806	bs1.bs2.bp6.bp7(Benign)
c.346C>A	p.Pro116Thr	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs115324397	pp2.bs1.bs2.bp6(Benign)
c.363T>C	p.Gly121=	Sessiz	0,0083	0	0	Novel	pm2.bp7(Benign)
c.422T>C	p.Leu141Pro	Yanlış anlamlı	0,925	0,4889	0,775	rs10178458	pp2.ba1.bp6.bp4(Benign)
c.469G>C	p.Gly157Arg	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs764451365	pm2.pp3.pp2(Muhtemel Patojenik)
c.485A>G	p.Glu162Gly	Yanlış anlamlı	0,925	0,4889	0,772	rs6436669	bp6.bp4(Benign)
c.547-9A>C	-----	İntronik	0,0083	0	0,011	rs55667591	ba1.bs2.bp6.bp4(Benign)
c.805G>A	p.Glu269Lys	Yanlış anlamlı	0,0167	0	0,018	rs80109666	ba1.bs2.bp6.bp4(Benign)
c.933+1G>T	-----	Splicing	0,0083	0	0	Novel	pvs1.pm2.pp3(Patojenik)
c.976G>T	p.Asp326Tyr	Yanlış anlamlı	0,4083	0,2667	0,24	rs55703767	ba1.bs2.bp6.bp4(Benign)
c.1195C>T	p.Leu399=	Sessiz	0,875	0,4667	0,654	rs10205042	ba1.bp6.bp7(Benign)
c.1223G>A	p.Arg408His	Yanlış anlamlı	0,175	0,1333	0,099	rs34505188	ba1.bs2.bp6.bp4(Benign)
c.1290A>G	p.Gly430=	Sessiz	0,0083	0	0	Novel	pm2.bp7(VUS)
c.1315+5A>C	-----	İntronik	0,0167	0	0	Novel	pm2.bp4(VUS)
c.1316-10A>T	-----	İntronik	0,0083	0	0	Novel	pm2.bp4(VUS)
c.1352A>G	p.His451Arg	Yanlış anlamlı	0,175	0,1333	0,102	rs11677877	pp2.ba1.bs2.bp4.bp6(Benign)
c.1353C>T	p.His451=	Sessiz	0,0083	0	0	rs189364374	bs1.bp6.bp7(Benign)
c.1354G>A	p.Gly452Arg	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs772958162	pm2.pp3.pp2.pp5(Muhtemel Patojenik)

c.1382G>A	p.Gly461Glu	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	Novel	pm2.pm5.pp3.pp2(Muhtemel Patojenik)
c.1452G>A	p.Gly484=	Sessiz	0,175	0,1333	0	rs34019152	ba1.bs2.bp7.bp6(Benign)
c.1721C>T	p.Pro574Leu	Yanlış anlamlı	0,5917	0,2444	0,38	rs28381984	pp2.ba1.bs2.bp7.bp6(Benign)
c.1853A>G	p.Tyr618Cys	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	Novel	pm1.pm2.pp2(VUS)
c.2331T>C	p.Gly777=	Sessiz	0,0083	0	0	Novel	pm2.bp7(VUS)
c.2389C>T	p.Pro797Ser	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	Novel	pm2.pm5.pp2(VUS)
c.2501A>G	p.Lys834Arg	Yanlış anlamlı	0,0167	0,0222	0,007	rs56226424	pp2.ba1.bs2.bp4.bp6(Benign)
c.2672T>C	p.Ile891Thr	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs765193194	pm2.pp2(VUS)
c.2826C>T	p.Pro942=	Sessiz	0,0083	0	0	rs201064766	pm2.bp7.bp6(Muhtemel Benign)
c.3182G>A	p.Gly1061Asp	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs202078295	pm2(VUS)
c.3258G>A	p.Gly1086=	Sessiz	0,0167	0	0	rs147085074	ba1.bs1.bs2.bp7.bp6(Benign)
c.3325C>T	p.Pro1109Ser	Yanlış anlamlı	0,025	0	0,004	rs55816283	pp2.bs1.bs2.bp6(Benign)
c.3508G>A	p.Gly1170Arg	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	Novel	pm2.pp3.pp2(VUS)
c.3588C>T	p.Ala1196=	Sessiz	0,0083	0	0	rs767337248	pm2.bp7(VUS)
c.3627G>A	p.Met1209Ile	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs200562865	pm2.ba1.bs2.bp6(Benign)
c.3772C>T	p.Pro1258Ser	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	Novel	pm2.pp2(VUS)
c.3829G>A	p.Asp1269Glu	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs190598500	pp3.pm2.pp5 (Patojenik)
c.4153+1del	-----	Splicing	0,0083	0	0	Novel	pvs1.pm2 (Muhtemel Patojenik)
c.4414T>C	p.Ser1472Pro	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	Novel	pm2.pp3.pp2(VUS)
c.4484A>G	p.Gln1495Arg	Yanlış anlamlı	0,0167	0	0,013	rs77964815	pp2.bs1.bs2.bp6(Benign)
c.4665G>A	p.Ala1555=	Sessiz	0,0083	0	0	rs200858199	bs1.bs2.bp7.bp6(Benign)
c.4929-2A>C	-----	Splicing	0,0083	0	0	Novel	pvs1.pm2(Muhtemel Patojenik)
c.*2G>A	3' UTR	UTR	0,0083	0	0	rs1367729493	pm2.bp7(VUS)

Tablo 4. 2 Hastaların *COL4A4* (NM_000092.5) geninde tespit edilen varyasyonlar

Varyasyon	Protein değişimi	Variant Tipi	Hasta Frekansı	Kontrol Frekansı	Genomize Frekansı	dbSNP	ACMG Kriterleri
c.4932C>T	p.Phe1644Phe	Yanlış anlamlı	0,5667	0,4	0	rs2228557	ba1.bs2.bp7bp6(Benign)
c.4760C>G	p.Pro1587Arg	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs190148408	ba1.bs2.bp6(Benign)
c.4731G>A	p.Ala1577=	Sessiz	0,0083	0	0	rs200639109	ba1.bs2.bp7.bp6(Benign)
c.4548A>G	p.Val1516=	Sessiz	0,6667	0,3778	0	rs2228555	ba1.bs2.bp7.bp6(Benign)
c.4444 delC	p.Leu1482TrpfsTer70	Küçük delesyon	0,0167	0	0	-	pvs1.pm2.pp3(Muhtemel Patojenik)
c.4523-8T>C	-----	İntronik	0,55	0,3778	0	rs13419076	ba1.bs2.bp4.bp6(Benign)
c.4207T>C	p.Ser1403Pro	Yanlış anlamlı	0,5833	0,3778	0,375	rs3752895	ba1.bs2.bp4.bp6(Benign)
c.4080G>A	p.Pro1360=	Sessiz	0,575	0,3778	0	rs2228556	ba1.bs2.bp7.bp6(Benign)
c.3979G>A	p.Val1327Met	Yanlış anlamlı	0,575	0,3778	0,374	rs2229813	ba1.bs2.bp4.bp6(Benign)
c.3817+9G>C	-----	İntronik	0,5917	0,3778	0	rs13423714	ba1.bs2.bp6(Benign)
c.3684G>A	p.Lys1228=	Sessiz	0,5917	0,3778	0	rs2229812	ba1.bs2.bp7.bp6(Benign)
c.3594G>A	p.Gly1198=	Sessiz	0,5917	0,3778	0	rs10203363	ba1.bs2.bp7.bp6(Benign)
c.3574_3577+8 delTCAGGT AAGCAC	p.Ser1192fs	Küçük delesyon	0,0083	0	0	rs1553627655	pvs1.pm2.pp5(Patojenik)
c.3011C>T	p.Pro1004Leu	Yanlış anlamlı	0,675	0	0,432	rs1800517	ba1.bs2.bp6(Benign)
c.2996G>A	p.Gly999Glu	Yanlış anlamlı	0,0083	0,0889	0	rs13027659	pp3.bs1.bs2.bp6(Benign)
c.2950_2953 delGGAT	p.Gly984SerfsTer53	Küçük delesyon	0,0083	0	0	Novel	pvs1.pm2(Muhtemel Patojenik)
c.2899A>G	p.Ile967Val	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0,009	rs80243096	ba1.bs2.bp4.bp6(Benign)

c.2879G>C	p.Gly960Ala	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	Novel	pm2.pm5.pp3(Muhtemel Patojenik)
c.2630G>A	p.Arg877Gln	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0,013	rs150979437	ba1.bs2.bp4.bp6(Benign)
c.2430C>G	p.Gly810=	Sessiz	0,0083	0,0889	0	rs769363556	pm2.bp7.bp6(Muhtemel Benign)
c.2384-5T>C	-----	İntronik	0,225	0	0	rs3769641	ba1.bs2.bp4.bp6(Benign)
c.2367A>T	p.Gly789=	Sessiz	0,0083	0	0	rs56247709	bs1.bs2.bp7.bp6(Benign)
c.2179A>G	p.Met727Val	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs1259639203	pm2(VUS)
c.2167T>C	p.Phe723Leu	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	Novel	pm2(VUS)
c.1833T>C	p.Gly611=	Sessiz	0,0167	0,0222	0	rs145806603	ba1.bs1.bs2.bp7.bp6(Benign)
c.1711_1712insA	p.Arg571LysfsTer4	Küçük insersiyon	0,0167	0,0222	0	Novel	pvs1.pm2(Muhtemel Patojenik)
c.1795G>C	p.Gly599Arg	Yanlış anlamlı	0,0083	0,3556	0	Novel	pm2.pp3(VUS)
c.1634G>C	p.Gly545Ala	Yanlış anlamlı	0,1167	0	0,027	rs1800516	pp3.ba1.bs2.bp6(Benign)
c.1444C>T	p.Pro482Ser	Yanlış anlamlı	0,6583	0	0,444	rs2229814	ba1.bs2.bp4.bp6(Benign)
c.1353C>T	p.Gly451=	Sessiz	0,0083	0	0	rs199511948	pm2.bp7.bp6(Muhtemel Benign)
c.1323T>C	p.Pro441=	Sessiz	0,0083	0	0	rs35830639	ba1.bs2.bp7.bp6(Benign)
c.568G>C	p.Gly190Arg	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	Novel	pm2.pp3(VUS)
c.289C>T	p.Arg97Cys	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs202096172	pm2(VUS)
c.226A>G	p.Ile76Val	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs546883881	pm2(VUS)
c.199C>T	p.Pro67Ser	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs755183371	pm2.pp3(VUS)
c.102A>G	p.Gln34=	Sessiz	0,0083	0	0	rs3817617	ba1.bs2.bp7.bp6(Benign)

c.17T>C	p.Ile6Thr	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs16823264	ba1.bs2.bp4.bp6(Benign)
---------	-----------	----------------	--------	---	---	------------	-------------------------

Tablo 4. 3 Hastaların *COL4A5* (NM_033380.2) geninde tespit edilen varyasyonlar

Varyasyon	Protein değişimi	Variant Tipi	Hasta Frekansı	Kontrol Frekansı	Genomize Frekansı	dbSNP	ACMG Kriterleri
c.169G>T	p.Gly57Ter	Anlamsız	0,0083	0	0	Novel	pvs1.pm2(Muhtemel Patojenik)
c.322-11G>A	-----	İntronik	0,0083	0	0	rs764068730	pm2.bp7(Muhtemel Benign)
c.546+11A>G	-----	İntronik	0,0083	0	0	rs1487692703	pm2.bp7(Muhtemel Benign)
c.891+5G>A	-----	Splicing	0,025	0	0	Novel	pm2.pp3(VUS)
c.981T>C	p.Asp327=	Silent	0,0083	0	0	rs1165228239	pm2(VUS)
c.1063A>C	p.Ile355Leu	Yanlış anlamlı	0,0167	0	0	rs867118537	pm2.pp2(VUS)
c.1340-1 delG	p.Ser447MetfsTer27	Küçük delesyon	0,0083	0	0	Novel	pvs1.pm2(Muhtemel Patojenik)
c.1718G>A	p.Gly573Asp	Yanlış anlamlı	0,0083	0,0222	0	rs104886138	pm1.pp2.pm2(Muhtemel Patojenik)
c.1871G>A	p.Gly624Asp	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs104886142	pm2.pp3.pp2.pp5(Patojenik)
c.2504A>G	p.Gln835Arg	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	Novel	pm1.pp2.pm2(VUS)
c.2553_2567 delTGGACTT GATGTTCC	p.Leu853_Gly857del	Küçük delesyon	0,0083	0	0	Novel	pm2.pm4.pm1(Muhtemel Patojenik)
c.2695G>T	p.Gly899Cys	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	Novel	pm1.pm2.pm5.pp3(Muhtemel Patojenik)
c.2768-11A>G	-----	İntronik	0,1333	0,0444	0	rs1006269	ba1.bs2.bp7.bp6(Benign)
c.3315G>A	p.Leu1105Leu	Yanlış anlamlı	0,0083	0	0	rs1415696204	pm2.bp7 (Muhtemel Benign)
c.3918A>G	p.Gly1307=	Silent	0,0083	0	0	Novel	pm2.bp7(VUS)

c.4516-2A>G	-----	Splicing	0,0083	0	0	-	pvs1.pm2(Muhtemel Patojenik)
c.4630delC	p.Met1551CysfsTer3	Küçük delesyon	0,0083	0	0	Novel	pvs1.pm2(Muhtemel Patojenik)
c.4708T>C	p.Cys1570Arg	Yanlış anlamlı	0,0167	0	0	rs281874745	pm1.pm2.pp3.pm5(Muhtemel Patojenik)
c.4808+1G>C	-----	Splicing	0,0167	0	0	Novel	pvs1.pm2(Muhtemel Patojenik)
c.*48ATA>A	3' UTR	UTR	0,0333	0	0	Novel	pm2.bp7(VUS)
c.*13T>C	3' UTR	UTR	0,0083	0	0	Novel	pm2.bp7(VUS)

Bu çalışmamızdaki 125 hastanın yeni nesil dizileme analiz sonucunda; 50 missense (yanlış anlamlı), 8 delesyon/duplikasyon, 17 splice bölge mutasyonu (+-20 baz), 3 3'UTR ve 25 sinonim varyasyonu olmak üzere toplam 103 varyasyon tespit edilmiştir.

Bu çalışmamızda 125 hastanın yeni nesil dizileme analizi sonucunda tespit edilen 103 varyasyonun Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji (ACMG) ve Moleküler Patoloji Derneği'nin 2015 yılında yayınlandığı rehberdeki kriterler referans alınarak çıkan değişiklikler değerlendirildiğinde (Richards et al., 2015; Savige et al., 2021) 21 patojenik veya muhtemel patojenik, 29 klinik önemi belirsiz (VUS), 53 tane benign veya muhtemel benign varyasyon saptanmıştır. Bu 103 varyasyonun 33 tanesi yeni varyasyon olarak saptanmıştır.

Toplam 125 AS şüpheli hastanın 27 (%21,6) tanesinde klinikle ilişkili olabileceği düşünülen varyasyon saptanırken 86 (%68,8) tanesinde ise klinik ile ilişkili olabileceği düşünülen varyasyon saptanmamıştır. Tablo 4.4'de hastaların klinik bulguları ve kliniğe sebep olduğu düşünülen varyasyonlar verilmiştir. Bazı genetik hastalık grupları AS benzeri klinik göstermektedir. AS ile ilişkili genlerde klinik olarak ilişkili varyasyonlara sahip olmayan bu 86 hasta, Epstein sendromu, Fechtner sendromu, May-Hegglin anomalisi, Fabry hastalığı, Alport benzeri glomerülonefrit ve Sebastian sendromları olan bu hastalıklarla ilişkili olabileceği düşündürmektedir (Amari et al., 1994; Heath et al., 2001; Legius et al., 1990).

Tablo 4. 4 Çalışmaya alınan hastaların klinik bulguları ve tespit edilen patojenik/muhtemel patojenik ve VUS varyasyonlar

Hasta	Yaş	Cinsiyet	Hematüri	Proteinüri	Hipertansiyon	Görme Kaybı	İşitme Kaybı	Böbrek Hastalıkları	Klinik İle İlişkili Olduğu Düşünülen Varyasyon
P1	12	F	+						(A4)c.1711_1712insA HT
P2	12	M		+			+		(A5)c.169G>T HEMİ
P3	12	F	+						(A3)c.145-21 delA HT/c.2389C>T HT (A5)c.4630delC HT
P4	16	M		+			+		(A3)c.1354G>A HT
P5	12	F	+	+					(A4)c.1711_1712insA HT
P6	41	F		+					(A5)c.4516-2A>G HT
P7	5	M	+						(A3)c.1382G>A HT
P8	32	M	+	+					(A5)c.4808+1G>C HEMİ
P9	29	M		+					(A5)c.4808+1G>C HEMİ
P10	47	F	+		+				(A5)c.1063A>C HT
P11	10	M					+		
P12	8	M		+					(A3)c.2672T>C HT
P13	36	F			+				
P14	19	F			+			Böbrek yetmezliği	
P15	18	F		+					
P16	14	M					+		(A5)c.4708T>C HEMİ
P17	40	F		+					
P18	44	F						Fokal Segmental Glomerüloskleroz	
P19	54	F	+						
P20	63	F						Böbrek yetmezliği	(A3)c.3772C>T HT
P21	15	M	+	+					
P22	38	M						Böbrek yetmezliği	
P23	8	F	+						(A5)c.*13T>C HT

P24	12	F	+						
P25	24	F		+					
P26	10	F	+						
P27	6	F		+					
P28	13	F	+					Ailesel Böbrek yetmezliği	
P29	16	M					+		(A3)c.1315+5A>C HT
P30	5	M	+				+		(A5)c.1718G>A HEMİ
P31	49	M						Böbrek yetmezliği	
P32	4	F	+						
P33	29	F					+	Böbrek yetmezliği	
P34	25	M		+					(A4)c.289C>T HT
P35	32	F		+					
P36	18	F		+					(A5)c.3918A>G HT
P37	9	F						Ailesel Böbrek yetmezliği	(A3)c.4153+1del HOMO
P38	10	F		+					
P39	31	M	+						
P40	6	M		+					(A5)c.1340-1 delG HEMİ
P41	7	F						Böbrek yetmezliği	(A3)c.3829G>A HT
P42	11	F						Böbrek taşı, kalkülüs	(A4)c.4444 delC HT
P43	13	M	+						
P44	14	F					+		
P45	9	F		+					(A4)c.2950_2953delGGAT HT
P46	57	M						Ailesel Böbrek yetmezliği	(A3)c.3508G>A HT
P47	25	F				+			
P48	10	M				+			

P49	14	F		+					
P50	53	F						Böbrek yetmezliği	
P51	30	M						Böbrek yetmezliği	
P52	11	M						Böbrek yetmezliği	
P53	41	F	+				+	Ailesel Böbrek yetmezliği	
P54	11	M					+		
P55	44	M	+						
P56	9	M	+						(A4)c.226A>G HT
P57	10	M	+						
P58	19	M		+					(A5)c.2553_2567delTGGACTTGATGTTCC HEMİ
P59	63	F					+		(A5)c.4708T>C HT
P60	35	F						Böbrek yetmezliği	(A5)c.891+5G>A HT
P61	35	F						Böbrek yetmezliği	(A4)c.568G>C HT
P62	12	M						Ailesel Böbrek yetmezliği	
P63	12	F	+						
P64	11	F						Ailesel Böbrek yetmezliği	(A5)c.891+5G>A HT
P65	14	F						Ailesel Böbrek yetmezliği	(A5)c.891+5G>A HT
P66	6	F	+						
P67	47	M		+					
P68	32	F						Ailesel Böbrek yetmezliği	
P69	37	F						Böbrek yetmezliği	
P70	20	F		+				Böbrek yetmezliği	
P71	38	F						Böbrek yetmezliği	(A5)c.1871G>A HOMO
P72	22	M		+				Böbrek yetmezliği	

P73	17	F						Böbrek yetmezliği	
P74	10	F						Böbrek yetmezliği	(A3)c.3182G>A HT
P75	8	M						Ailesel Böbrek yetmezliği	
P76	3	M		+					(A5)c.2695G>T HEMİ
P77	28	M						Fokal Segmental Glomerüloskleroz	
P78	47	F						Böbrek yetmezliği	
P79	9	M					+		
P80	26	M		+					
P81	38	F	+						
P82	43	M	+						
P83	11	M		+					(A5)c.1063A>C HEMİ
P84	25	M						İnce Bazal Membran Nefropatisi	
P85	40	F						Ailesel Böbrek yetmezliği	
P86	18	M					+		
P87	28	M						İnce Bazal Membran Nefropatisi	
P88	15	M					+		
P89	12	M	+						
P90	21	F						Fokal Segmental Glomerüloskleroz	
P91	40	F		+				Fokal Segmental Glomerüloskleroz	
P92	16	M		+					
P93	10	F					+		
P94	14	M	+						(A4)c.2879G>C HT

P95	12	M		+					
P96	14	M						Böbrek taşı, kalkülüs	(A4)c.4444 delC HT
P97	38	M	+						
P98	27	F	+						
P99	44	M		+					
P100	51	M	+						(A4)c.3574_3577+8delTCAGGTAAGCAC HT
P101	42	F		+					(A3)c.469G>C HT
P102	17	M					+		
P103	34	M		+					
P104	16	M					+		(A3)c.2T>C HOMO
P105	4	M	+						(A3)c.4929-2A>C HOMO
P106	12	M	+			+			
P107	24	M	+					Böbrek yetmezliği	
P108	59	F						Fokal Segmental Glomerüloskleroz	
P109	38	M						Fokal Segmental Glomerüloskleroz	
P110	35	M						Fokal Segmental Glomerüloskleroz	(A3)c.*2G>A HT (A4) c.1957A>G HT
P111	4	F							
P112	27	F						Ailesel Böbrek yetmezliği + Fokal Segmental Glomerüloskleroz	
P113	11	M		+					
P114	28	M						Dispepsi	
P115	24	M						Böbrek nakli	
P116	8	F		+					
P117	19	F		+					

P118		F							
P119	12	M	+						
P120	61	F				+			
P121	15	M						Böbrek yetmezliği	(A3)c.933+1G>T HOMO
P122	4	M		+					
P123	3	M	+						
P124	16	F		+					
P125	31	M		+			mild	Böbrek yetmezliği, nefrokalsinozis	

HOMO: homozigot, HT: heterozigot, HEMİ: hemizigot

Hastaların anamnez taramalarına göre herhangi böbrek hastalığı olan 45 (%36) hastanın 11'inde klinik ile ilişkili olduğu düşünülen varyasyon tespit edilmiştir. Böbrek hastalığı olan hastaların 26 tanesi kadın, 19 tanesi erkek olarak belirlenmiştir. Varyasyon taşıyan böbrek hastalıklarına eşlik eden ikinci bir bulguya rastlanmamıştır. Bu hastalarda 7 tanesi kadın iken 4 tanesi erkek hasta olarak tespit edilmiştir. Bu hastaların yaş ortalamaları ise 23,5 (8-63 yaş) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hastaların 4'ünde *COL4A5*, 2'sinde *COL4A3*, 3'ünde *COL4A4* genlerinde varyasyon saptanırken 1 hastada *COL4A3* ve *COL4A4* genlerinde digenik heterozigot varyasyonlar saptanmış olup hepsinde otozomal dominant kalıtım gösteren hastalardır. Böbrek hastalıkları seyreden hastalarda 2'sinde hematüri, 3'ünde proteinüri, 1'inde hipertansiyon, 1'inde hem işitme kaybı hem de hematüri ve 1'inde hem işitme kaybı hemde proteinüri eşlik etmiştir.

İşitme kaybı olan hastalar incelendiğinde 18 (%14,4) hastadan 7'sinde klinik ile ilişkili olduğu düşünülen varyasyon tespit edilmiştir. İşitme kaybı görülen hastaların 5 tanesi kadın, 13 tanesi erkek olarak belirlenmiştir. Varyasyon taşınan erkeklerde işitme kaybı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0,00174$). Varyasyon taşıyan işitme kayıplarına 2 hastada proteinüri eşlik ederken 1 hastada hematüri eşlik etmiştir. Bu hastaların yaş ortalamaları ise 23,3 (5-63 yaş) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hastaların 4'ünde *COL4A5* ve 3'ünde *COL4A3* varyasyonlar saptanmış olup 1 hastada otozomal resesif kalıtım görülürken diğerlerinde otozomal dominant kalıtım görülmüştür. İşitme kaybı seyreden hastalarda 2'ünde hematüri, 3'ünde proteinüri eşlik etmiştir.

Hastalardan sadece hematüri görülen 25 hastanın sadece 7'sinde klinik ile ilişkili olduğu düşünülen varyasyon saptanmıştır. Sadece proteinüri görülen 29 hastanın sadece 11'inde klinik ile ilişkili olduğu düşünülen varyasyon saptanmıştır. Sadece hipertansiyon görülen 4 hastanın hiçbirinde klinik ile ilişkili olduğu düşünülen varyasyon saptanmamıştır. Hipertansiyon ve hematüri görülen bir hastada klinik ile ilişkili olduğu düşünülen varyasyon saptanmıştır. Sadece işitme kaybı görülen 13 hastanın sadece 4'ünde klinik ile ilişkili olduğu düşünülen varyasyon saptanmıştır.

Hastalardan elde edilen dataların analizi sonucu *COL4A3* geninde 45 varyasyon tespit edilmiştir. Bu varyasyonlar Amerikan Tıbbi Genetik Koleji (ACMG) ve Moleküler Patoloji Derneği'nin 2015 yılında yayınlandığı rehberdeki kriterler referans alınarak değerlendirildiğinde 20 benign, 1 muhtemel benign, 16 VUS, 3 patojenik ve 5 tanesi muhtemel patojenik olarak ACMG kriterleri içerisinde yer almaktadır. Bu gende toplamda 14 tane yeni varyasyon olduğu saptanmıştır.

COL4A4 geninde 37 varyasyon tespit edilmiştir. Bu varyasyonlar Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji (ACMG) ve Moleküler Patoloji Derneği'nin 2015 yılında yayınlandığı rehberdeki kriterler referans alınarak değerlendirildiğinde 23 benign, 2 muhtemel benign, 7 VUS, 1 patojenik ve 4 tanesi muhtemel patojenik olarak ACMG kriterleri içerisinde yer almaktadır. Bu gende toplamda 6 tane yeni varyasyon olduğu saptanmıştır.

COL4A5 geninde 21 varyasyon tespit edilmiştir. Bu varyasyonlar Amerikan Tıbbi Genetik Koleji (ACMG) ve Moleküler Patoloji Derneği'nin 2015 yılında yayınlandığı rehberdeki kriterler referans alınarak değerlendirildiğinde 1 benign, 3 muhtemel benign, 7 VUS, 1 patojenik ve 9 tanesi muhtemel patojenik olarak ACMG kriterleri içerisinde yer almaktadır. Bu gende toplamda 11 tane yeni varyasyon olduğu saptanmıştır.

4.2 Öneriler

Bu çalışmada AS şüphesi ile takipli hastaların klinik bilgileri ile genetik analiz sonuçlarının değerlendirilmesi yapılarak genotip fenotip korelasyonunun kurulması hedeflenmiştir. Doğum yeri Türkiye'nin farklı illerinde olan 125 farklı hastaya ait genetik ve anamnez verileri toplanmış ve değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda çalışmamızın tanı değeri %20 olarak belirtilmiştir. Fakat moleküler genetik tanıdaki en güncel zorluk VUS varyasyonların değerlendirilmesidir. Aile üyelerinde yapılan segregasyon analizi, *in siliko* analizler, protein ürünü üzerindeki yapısal ve fonksiyonel testler bu VUS kriterine giren varyasyonların tanıya katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda yer alan hastaların başvuru zamanında tespit edilen yaşları ortalama $23,2 \pm 20$ yıl olarak (3-63 yaş) olarak hesaplanmıştır. Ayrıca hastaların 61'i kadın (%48,8) ve 64'ü erkek (%51,2) olup kadın erkek oranı 0,95 olarak tespit

edilmiştir. Literatürlerde kadın erkek oranları ve hastaların ortalama başvuru yaşları seçilen hastalara göre farklılık göstermektedir. Ozdemir ve arkadaşları tarafından, 46'sı erkek ve 41'i kadın olan AS'li çocuk hastaların incelendiği geniş kapsamlı bir çalışmada hastaların ilk başvurudaki ortalama yaşları $7,6 \pm 4,1$ olarak bildirilmiştir (Ozdemir et al., 2020).

Çalışmamızda başvuru ve tanı yaşı oldukça düşük gözükmekte (3 yaş) ve bu hastada proteinüri ile başlayan erkek hastada *COL4A5* geninde hemizigot c.2695G>T varyasyonu saptanmıştır. 3-10 yaş arası 25 çocuktan 6 tanesinde patojenik veya muhtemel patojenik varyasyon saptanırken 3 tanesinde VUS kriterinde ve klinik ile ilişkili olduğu düşünülen varyasyon tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki yaş ortalamasının erişkin ve çocuk hastalarının birlikte dahil edilmesinden dolayı yükselmiştir. Genetik tanı, klinik bulguların daha hafif ve geç dönemde ortaya çıktığı AS şüphesi olan hastalarda tanı koyma oranını artırdığını ve çalışmadaki kadın erkek cinsiyet eşitliğinin dağılımın anlamlı olması için gerekli olduğunu düşünüyoruz.

Ailesinde veya kendisinde böbrek hastalığı öyküsü olan bireylerin AS olduğu hakkında şüphelenilmesinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada 33 hastanın 18'inde (%54,5) ailelerinde böbrek hastalığı veya bulguları saptanmışken (Hea Min Jang, 2020), 29 hastanın dahil edildiği başka bir çalışmada ise bu oran %86 olarak bildirilmiştir (Zhao et al., 2019). Çalışmamızda da benzer olarak toplam 125 hastanın 45 tanesinde (%36) böbrek ile ilgili hastalığı tespit edilmiş olup bu hastalardan da 11 tanesi (%24,4) ise klinik ile ilişkili olarak şüphelenilen varyasyon tespit edilmiştir. Diğer çalışmalara oranla böbrek hastalıklarının yüzde olarak az tespit edilmesi AS ile karıştırılan diğer sendrom ya da böbrek hastalıkları ile karıştırılmış olduğu düşünülmüştür.

AS'de oküler bozukluklar yaygın olup özellikle X'e bağlı AS'li bireylerin yaklaşık %30-40'ında görülür. Ön lens bulguları, AS'nin karakteristik bir oküler belirtisidir ve bireylerin yaklaşık %75'inde iki taraflıdır. Doğumda yoktur ve genellikle 20'li veya 30'lu yaşlarda ortaya çıkar. Öne doğru çıkıntılar sadece Alport sendromlu ailelerde görülmekte birlikte hemen hemen herkes 30 yaşından önce işitme kaybı yaşar ve SDBY'ye ilerler (Oka et al., 2014). En yaygın göz değişiklikleri, X'e bağlı

AS'li hastalarda meydana gelir. Otozomal resesif AS'li erkeklerin %85'i ve hastaların %87'si periferik nokta retinopatisi geliştirir. Alport sendromlu hastalarda kornea değişiklikleri nadirdir ve tekrarlayan kornea erozyonları, kornea opasitesi ve posterior polimorfik kornea distrofisi oluşabilir (Zhang & Ding, 2018).

Çalışmamıza alınan hastaların öyküleri incelendiğinde görme kaybı kliniği olan 2 hastadan 12 yaşında erkek hematüri eşliğinde ve 61 yaşında kadın AS şüphesi ile genetik kliniğine başvurmuş fakat kliniğinden sorumlu olabilecek bir varyasyona rastlanmamıştır.

Alport sendromu, glomerüllerin, gözlerin ve kulakların bazal zarlarını etkileyen ilerleyici bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda otozomal dominant AS'de böbrek yetmezliği gelişimi genellikle geç evrede (ortalama yaş 50-80) ortaya çıkar ve işitme kaybı ve göz anormallikleri nadirdir (Kamiyoshi et al., 2016; Marcocci et al., 2009). Dominant kalıtımı olan hastaların genetik tanısının mümkün olduğunca erken konulması ve rutin takiplerin düzenli olarak yapılması önemlidir. Klinik bulguların daha sonra yapılması beklenir. Bu, nadir görülen işitme kaybı ve göz anormalliklerinin erken teşhisine ve tedavisine yardımcı olacaktır. Ayrıca diğer genetik paternlere sahip hastaların erken tanı ve tedavi imkanı hastalığın morbidite ve mortalitesini azaltmaya yardımcı olabilir.

AS'da işitme kaybı sık görülür ve hastalığın erken belirtilerinden biridir. İşitme doğumda normaldir ve işitme bozukluğu genellikle geç çocukluk veya erken ergenlik döneminde ortaya çıkar. Özellikle yüksek frekansları (2000-8000 Hz) etkileyen ilerleyici bilateral sensörinöral işitme kaybı şeklinde ortaya çıkar ve işitme testleri ile teşhis konur (Kashtan, 2021). Çalışmamızda AS şüphesi ile başvuran 125 hastanın 18'inde (%14,4) işitme kaybı ile ilgili şikayet olduğu saptanmıştır. Bu hastaların 7'sinde (%5,6) klinik ile ilişkili olduğu düşünülen varyasyon saptanmıştır. İşitme kaybı gelişen ve varyasyon taşıyan hastaların 6 tanesi erkek ve 5-63 yaş (ortalama 23,3 yaş) arasında olduğu saptanmıştır. Literatür incelendiğinde 33 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada hastaların %33'ünde sensörinöral işitme kaybı olduğu ve ortalama tanı yaşının 21,5 yıl olduğu (Hea Min Jang, 2020) saptanmıştır. 42 kişinin katıldığı bir başka çalışmada

ise 6 (%20,6) hasta işitme kaybı bildirilmiştir (Zhao et al., 2019). Özdemir ve arkadaşlarının ülkemizde yaptığı kapsamlı bir çalışmada, çalışmaya 34'ü (%39) işitme kaybı bildiren 87 çocuk AS hastası dahil edilmiştir (Ozdemir et al., 2020). Ayrıca 48 makale dahil edilme kriterlerine göre incelenmiştir. 254 aileden 777 hastanın değerlendirildiği sistematik bir çalışmada işitme kaybı oranı %15,6 olarak bulunmuştur (Matthaiou et al., 2020). Çalışmamızda bulduğumuz hastaların işitme kaybı oranı literatürün altında kalmakla birlikte tanı anındaki yaş ortalaması literatüre benzerlik göstermektedir. 18 yaş altı hastalarda işitme bozukluğu çok yaygın olduğu görülmüştür (14 hastada). AS tanısı konduktan sonra düzenli işitme testi ile takip etmek işitme kaybı oranının daha yükselteceğini tahmin etmekteyiz.

X'e bağlı AS'nun işitme kaybı esas olarak erkek hastalarda daha sık görülür ve erkekler kadınlardan daha ciddi şekilde etkilenmektedir. X'e bağlı AS'li erkek hastaların yaklaşık %90'ı ve kadın hastaların yaklaşık %12'si 40 yaşından önce işitme kaybına sahiptir (Jais et al., 2003; Jais et al., 2000). Otozomal çekinik AS'li hastaların ortalama başlangıç yaşı 20'dir. Hastaların yaklaşık %64'ünde işitme kaybı vardır (Lee et al., 2019). Otozomal dominant AS'de işitme kaybı son derece nadir olan geç evrede ortaya çıkar (Nozu et al., 2019).

Çalışmamızda klinik ile ilişkili olduğu düşünülen varyasyona sahip 7 hastanın kalıtları incelendiğinde 4 hastanın (%57) X'e bağlı, 1 hastanın (%14) otozomal resesif ve 2 hastanın (%29) otozomal dominant kalıtım modeline sahip oldukları görülmüştür. X'e bağlı kalıtımın diğer kalıtım paternlerine göre daha baskın olduğu görülürken bunu otozomal dominant kalıtım takip etmiştir. Bu duruma göre X'e bağlı AS hastalarında kalıtım modeli ile işitme kaybı arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür ($p=0,298$).

Tedavi edilmeyen erkek X'e bağlı AS hastalarında 40 yaşından önce SDBY'nin ilerleme oranı %90 ve SDBY'nin ortalama gelişme yaşı 25'tir (Jais et al., 2000). X'e bağlı kadın hastalarda 40 yaşından önce SDBY geliştirme riski yaklaşık %12 iken 60 yaşına gelindiğinde bu oran %30'a çıkmaktadır (Jais et al., 2003). Otozomal çekinik AS'de kadın ve erkek arasında SDBY gelişimi açısından fark yoktur ve SDBY gelişme yaşı ortalama 21-22 yıldır (Oka et al., 2014; Storey et al.,

2013). Otozomal dominant AS'li hastalarda klinik belirtilerin ortaya çıkması nispeten yavaş ve geç olur. Etkilenen bireylerin SDBY'ye ilerleme yaşı 50 ile 80 arasındadır.

Çalışmamızda 125 hastanın klinik bilgileri incelendiğinde böbrek hastalıkları ile ilgili bilgiler elde edilmiştir. Buna göre 44 hastada (%35,2) böbrek yetmezliği, ince bazal membrane nefropati ve FSGS geliştiği saptanmış fakat bunların kaç tanesinin sonrasında böbrek nakli olduğu bilinmemektedir. Böbrek yetmezliği ortalama başlangıç yaşı 23 ± 15 yıl (8-63 yaş) olarak hesaplanmıştır. Bu hastaların 9'unda klinik ile ilişkili olduğu düşünülen varyasyon saptanmıştır. Varyasyon saptanan en küçüğü 11 yaşında kadın hasta olduğu belirlenmiştir. 6 kadın 3 erkekde (Kamiyoshi et al., 2016; Storey et al., 2013) klinik ile ilişkili olduğu düşünülen varyasyon en fazla *COL4A5* geninde saptanmıştır.

Bazı literatür çalışmalarında proteinüri varlığının SDBY'nin progresyonu ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bildirilmiştir (Pochet et al., 1989). Heterozigot taşıyıcılarda bile proteinüri varlığının hastalığın genetik paterni ile hiçbir ilgisi olmadığına ve ilerleyici böbrek hastalığı riskini artırdığına dair raporlar bile vardır (Kruegel et al., 2013). Çalışmamızda 125 hastanın 44'sinde böbrek hastalığı varlığı veya yokluğuna göre proteinüri analizi yapılmıştır. 38 proteinürili hastanın 4'ünde (%10,5) böbrek hastalığı görülmesine rağmen, 34 böbrek hastalığı olan kişilerde proteinüri saptanmamıştır. Çalışmamızda hastalarda proteinüri varlığı ile böbrek hastalıkları riski arasında literatürle uyumlu istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

45 KBH hastasının 14'ünde klinik ile ilişkili olduğu düşünülen varyasyon saptanmıştır. Varyasyon saptanan hastaların 4'ü (%28,5) X'e bağlı ve 2'si (%14,2) otozomal çekinik olarak saptanmıştır. 5'i (%35,7) otozomal dominant kalıtım paternine sahip ve 1 hastanın (%7,1) ise dijenik olduğu saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada çekinik kalıtım paterni, KBH gelişiminde *COL4A3* geni otozomal resesif kalıtım prognostik bir faktördür (Ozdemir et al., 2020). Fakat literatürde bildirilen ortak görüşe göre ise %55'i X' bağlı, %15'i otozomal resesif ve yaklaşık %20'si otozomal dominanttır olduğu bildirilmiştir (Kashtan & Gross, 2021). Ancak bizim

çalışmamızda Alport sendromunun genetik paterni ve böbrek hastalıklarını varlığı ile ilgili dominant kalıtım daha ön planda olduğu farkedilmiştir.

Türkiye'de AS ile ilgili nüfus çalışmaları çok sınırlı olup, hasta sayıları, yeni nesil dizileme yöntemleri ve moleküler çalışmalar açısından kısıtlılıkları mevcuttur. Yapılan bir çalışmada hasta sayısı bakımından kısıtlılık mevcuttur (Koç et al., 2019; Uzak et al., 2013). Moleküler genetik çalışmalar sendromun tanısında önemli rol oynamaktadır. Bu yüzden hastalara genetik açıdan yaklaşım tanı koymada önemli rol oynamaktadır (Döven et al., 2018). Yapılan çalışmalarda AS tanısı alan hastalar bebeklikten yaşlılığa kadar hayatın her evresinden rapor edilmiştir. Çalışmalara her yaştan birey ilave edilmesi çalışmanın kapsamını arttıracak olgu olduğu düşünülmektedir (Arı et al., 2020). Ayrıca çalışmalarda kontrol grubunun dahil edilmesiyle sağlıklı bireylerde tespit edilen varyasyonların patojeniteleri ile ilgili daha sağlıklı tespitler yapılır.

Literatürde 3 gen (*COL4A3*, *COL4A4* ve *COL4A5*) AS ile ilişkilendirilmiş ve tanısız varyantların yarısından azında patojenik *COL4A3* ve *COL4A4* varyasyonları saptanmıştır. Bu çalışmada varyant tespit ettiğimiz olgular arasında AS'de diagnostic olarak varyasyon tespit oranlarımız %20 idi (4 böbrek hastalığı %20, 6 işitme kaybı %30, 15 hematüri-proteinüri %50). Bu çalışmanın bulguları çeşitli sınırlamalar ışığında değerlendirilmelidir. İlk olarak, patojenik veya muhtemel patojenik varyantın yokluğunda, klinik tanının temeli gözden geçirilmelidir. AS'ye benzer klinik özellikler (Epstein sendromu, Fechtner sendromu, May-Hegglin anomalisi, Fabry hastalığı, Alport benzeri glomerülonefrit, Sebastian sendromları ve *MYH9* ile ilişkili bozukluklar vb.) üreten varyantlara sahip genler araştırılmalıdır (Heath et al., 2001; Pecci et al., 2008). Daha sonra, bazı hastalığa neden olan varyasyonlar, incelenen genlerin intronik bölgelerinde veya burada sıralanmamış promotör ve düzenleyici bölgelerinde ortaya çıkabilir. Ayrıca, hastaların enzim aktivitelerini ölçmeye veya yeni tanımlanan varyantların başka herhangi bir fonksiyonel analizini yapmaya çalışmadık. Son olarak, majör delesyonlar ve eklemeler de dahil olmak üzere tüm mutasyon olaylarını araştırmadık.

Sonuç olarak, AS izole hematüriden proteinüriye, böbrek hasarına ve nihayetinde böbrek hastalıklarından yetmezliğine kadar değişen böbrek belirtileri olan ilerleyici bir hastalıktır. Ailelerde dahi çok değişken klinik spektruma sahip glomerüler bazal membran hastalığıdır. İşitme kaybı ve göz değişiklikleri gibi renal olmayan klinik semptomların varlığı ve ailede böbrek hastalığı öyküsünün varlığı AS tanısını harekete geçirmelidir. AS'nin patolojik tanısı için böbrek biyopsisinin elektron mikroskopi incelemesinde spesifik hastalığa özgü bulguların varlığı esastır. Ancak invaziv bir işlem olduğu için erkek X'e bağlı AS hastalarında ve otozomal çekinik AS hastalarında bile bu karakteristik değişiklikler her zaman erken saptanamaz ve bazı hastalara daha geç tanı konulabilir. YND teknolojisinin geliştirilmesi ve yaygınlaştırılması, AS'nin invaziv olmayan ve oldukça hassas genetik teşhisi olasılığını artırmıştır. Hızlı ve doğru tanı koyma yeteneğine ek olarak, fenotip-genotip korelasyonunun sağlanmasını kolaylaştırmak, gelecekte etkilenebilecek aile üyelerinin taranmasına yardımcı olacak ve doğru genetik önerilerde bulunacaktır.

- Alport, A. C. (1927). Hereditary Familial Congenital Haemorrhagic Nephritis. *Br Med J*, 1(3454), 504-506. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.3454.504>
- Alves, F. R. A., & de Andrade Quintanilha Ribeiro, F. (2008). Clinical data and hearing of individuals with Alport syndrome. *Braz J Otorhinolaryngol*, 74(6), 807-814. [https://doi.org/10.1016/S1808-8694\(15\)30140-3](https://doi.org/10.1016/S1808-8694(15)30140-3)
- Amari, F., Segawa, K., & Ando, F. (1994). Lens coloboma and Alport-like glomerulonephritis. *Eur J Ophthalmol*, 4(3), 181-183. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7819734>
- Arı, M. E., OZLU, S. G., DEMİRCİN, G., YILMAZ, A. C., AYDOG, O., & BULBUL, M. (2020). Çocukluk Çağı Hematüri Olgularında Etiyolojik Nedenlerin İncelenmesi. *Türkiye Çocuk Hastalıkları Dergisi*, 14(6), 480-487. <https://doi.org/0.12956/tchd.597567>
- Bae, E. H., Fang, F., Williams, V. R., Konvalinka, A., Zhou, X., Patel, V. B., Song, X., John, R., Oudit, G. Y., Pei, Y., & Scholey, J. W. (2017). Murine recombinant angiotensin-converting enzyme 2 attenuates kidney injury in experimental Alport syndrome. *Kidney Int*, 91(6), 1347-1361. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.12.022>
- Bao, R., Huang, L., Andrade, J., Tan, W., Kibbe, W. A., Jiang, H., & Feng, G. (2014). Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. *Cancer Inform*, 13(Suppl 2), 67-82. <https://doi.org/10.4137/CIN.S13779>
- Barker, D. F., Pruchno, C. J., Jiang, X., Atkin, C. L., Stone, E. M., Denison, J. C., Fain, P. R., & Gregory, M. C. (1996). A mutation causing Alport syndrome with tardive hearing loss is common in the western United States. *Am J Hum Genet*, 58(6), 1157-1165. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8651292>
- Barozzi, S., Soi, D., Intieri, E., Giani, M., Alde, M., Tonon, E., Signorini, L., Renieri, A., Fallerini, C., Perin, P., Montini, G., & Ambrosetti, U. (2020). Vestibular and audiological findings in the Alport syndrome. *Am J Med Genet A*, 182(10), 2345-2358. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61796>
- Basta-Jovanovic, G., Venkateshan, V. S., & Churg, J. (1990). Correlation of glomerular basement membrane alterations with clinical data in progressive hereditary nephritis (Alport's syndrome). *Am J Kidney Dis*, 16(1), 51-56. [https://doi.org/10.1016/s0272-6386\(12\)80785-2](https://doi.org/10.1016/s0272-6386(12)80785-2)
- Bekheirnia, M. R., Reed, B., Gregory, M. C., McFann, K., Shamshirsaz, A. A., Masoumi, A., & Schrier, R. W. (2010). Genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 21(5), 876-883. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009070784>

- Bollee, G., Flamant, M., Schordan, S., Fligny, C., Rumpel, E., Milon, M., Schordan, E., Sabaa, N., Vandermeersch, S., Galaup, A., Rodenas, A., Casal, I., Sunnarborg, S. W., Salant, D. J., Kopp, J. B., Threadgill, D. W., Quaggin, S. E., Dussaule, J. C., Germain, S., . . . Tharaux, P. L. (2011). Epidermal growth factor receptor promotes glomerular injury and renal failure in rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Nat Med*, *17*(10), 1242-1250. <https://doi.org/10.1038/nm.2491>
- Bower, K. S., Edwards, J. D., Wagner, M. E., Ward, T. P., & Hidayat, A. (2009). Novel corneal phenotype in a patient with alport syndrome. *Cornea*, *28*(5), 599-606. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31818f9706>
- Bragg, L. M., Stone, G., Butler, M. K., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2013). Shining a light on dark sequencing: characterising errors in Ion Torrent PGM data. *PLoS Comput Biol*, *9*(4), e1003031. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003031>
- Chen, L., Xue, J., Zhang, Y., Wang, F., Chen, S., Duan, J., Liu, Y., & Ding, J. (2014). [Analysis of the clinical audiological characteristics in 92 Chinese Alport syndrome cases]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, *49*(11), 902-907. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25598368>
- Chen, W., Tang, D., Dai, Y., & Diao, H. (2019). Establishment of microRNA, transcript and protein regulatory networks in Alport syndrome induced pluripotent stem cells. *Mol Med Rep*, *19*(1), 238-250. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9672>
- Chen, Y. M., Zhou, Y., Go, G., Marmorstein, J. T., Kikkawa, Y., & Miner, J. H. (2013). Laminin beta2 gene missense mutation produces endoplasmic reticulum stress in podocytes. *J Am Soc Nephrol*, *24*(8), 1223-1233. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012121149>
- Chung, A. C., Yu, X., & Lan, H. Y. (2013). MicroRNA and nephropathy: emerging concepts. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, *6*, 169-179. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S37885>
- Coppo, R., Gianoglio, B., Porcellini, M. G., & Maringhini, S. (1998). Frequency of renal diseases and clinical indications for renal biopsy in children (report of the Italian National Registry of Renal Biopsies in Children). Group of Renal Immunopathology of the Italian Society of Pediatric Nephrology and Group of Renal Immunopathology of the Italian Society of Nephrology. *Nephrol Dial Transplant*, *13*(2), 293-297. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.ndt.a027821>
- Cunha, M. L., Meijers, J. C., & Middeldorp, S. (2015). Introduction to the analysis of next generation sequencing data and its application to venous thromboembolism. *Thromb Haemost*, *114*(5), 920-932. <https://doi.org/10.1160/TH15-05-0411>
- Dagher, H., Buzza, M., Colville, D., Jones, C., Powell, H., Fassett, R., Wilson, D., Agar, J., & Savage, J. (2001). A comparison of the clinical, histopathologic, and ultrastructural phenotypes in carriers of X-linked and autosomal

- recessive Alport's syndrome. *Am J Kidney Dis*, 38(6), 1217-1228. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2001.29217>
- Dahan, K., Heidet, L., Zhou, J., Mettler, G., Leppig, K. A., Proesmans, W., David, A., Roussel, B., Mongeau, J. G., Gould, J. M., & et al. (1995). Smooth muscle tumors associated with X-linked Alport syndrome: carrier detection in females. *Kidney Int*, 48(6), 1900-1906. <https://doi.org/10.1038/ki.1995.489>
- Dlamini, Z., Francies, F. Z., Hull, R., & Marima, R. (2020). Artificial intelligence (AI) and big data in cancer and precision oncology. *Comput Struct Biotechnol J*, 18, 2300-2311. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.019>
- Döven, S. S., TEKE, S., GURSES, İ., YILMAZ, B. C., BALLI, E., & DELİBAŞ, A. (2018). Alport Sendromu tanısında böbrek biyopsisi ve elektron mikroskopinin önemi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 11(1), 32-37. <https://doi.org/10.26559/mersinsbd.393774>
- Eduardoff, M., Santos, C., de la Puente, M., Gross, T. E., Fondevila, M., Strobl, C., Sobrino, B., Ballard, D., Schneider, P. M., Carracedo, A., Lareu, M. V., Parson, W., & Phillips, C. (2015). Inter-laboratory evaluation of SNP-based forensic identification by massively parallel sequencing using the Ion PGM. *Forensic Sci Int Genet*, 17, 110-121. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.04.007>
- Fawzi, A. A., Lee, N. G., Elliott, D., Song, J., & Stewart, J. M. (2009). Retinal findings in patients with Alport Syndrome: expanding the clinical spectrum. *Br J Ophthalmol*, 93(12), 1606-1611. <https://doi.org/10.1136/bjo.2009.158089>
- Flusberg, B. A., Webster, D. R., Lee, J. H., Travers, K. J., Olivares, E. C., Clark, T. A., Korlach, J., & Turner, S. W. (2010). Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nat Methods*, 7(6), 461-465. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1459>
- Fryer, R. M., Rakestraw, P. A., Nakane, M., Dixon, D., Banfor, P. N., Koch, K. A., Wu-Wong, J. R., & Reinhart, G. A. (2007). Differential inhibition of renin mRNA expression by paricalcitol and calcitriol in C57/BL6 mice. *Nephron Physiol*, 106(4), p76-81. <https://doi.org/10.1159/000104875>
- Gast, C., Pengelly, R. J., Lyon, M., Bunyan, D. J., Seaby, E. G., Graham, N., Venkat-Raman, G., & Ennis, S. (2016). Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*, 31(6), 961-970. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv325>
- Germain, D. P., Hughes, D. A., Nicholls, K., Bichet, D. G., Giugliani, R., Wilcox, W. R., Feliciani, C., Shankar, S. P., Ezgu, F., Amartino, H., Bratkovic, D., Feldt-Rasmussen, U., Nedd, K., Sharaf El Din, U., Lourenco, C. M., Banikazemi, M., Charrow, J., Dasouki, M., Finegold, D., . . . Schiffmann, R. (2016). Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat. *N Engl J Med*, 375(6), 545-555. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1510198>

- Gomez, I. G., MacKenna, D. A., Johnson, B. G., Kaimal, V., Roach, A. M., Ren, S., Nakagawa, N., Xin, C., Newitt, R., Pandya, S., Xia, T. H., Liu, X., Borza, D. B., Grafals, M., Shankland, S. J., Himmelfarb, J., Portilla, D., Liu, S., Chau, B. N., & Duffield, J. S. (2015). Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *J Clin Invest*, *125*(1), 141-156. <https://doi.org/10.1172/JCI75852>
- Grodecki, K. M., Gains, M. J., Baumal, R., Osmond, D. H., Cotter, B., Valli, V. E., & Jacobs, R. M. (1997). Treatment of X-linked hereditary nephritis in Samoyed dogs with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor. *J Comp Pathol*, *117*(3), 209-225. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(97\)80016-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(97)80016-3)
- Gross, O., Netzer, K. O., Lambrecht, R., Seibold, S., & Weber, M. (2003). Novel COL4A4 splice defect and in-frame deletion in a large consanguine family as a genetic link between benign familial haematuria and autosomal Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, *18*(6), 1122-1127. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfg157>
- Hea Min Jang, H. S. B., Sun-Hee Park, Yong-Lim Kim, Chan-Duck Kim, Hee-Yeon Jung, Jang-Hee Cho, Man Hoon Han, Yong Jin Kim, Min Hyun Cho,. (2020). Clinical Characteristics and Long-Term Prognosis of Alport Syndrome: A Retrospective Single-Center Study. *Childhood Kidney Diseases*, *24*(2)), 91-97. <https://doi.org/10.3339/jkspn.2020.24.2.91>
- Heath, K. E., Campos-Barros, A., Toren, A., Rozenfeld-Granot, G., Carlsson, L. E., Savige, J., Denison, J. C., Gregory, M. C., White, J. G., Barker, D. F., Greinacher, A., Epstein, C. J., Glucksman, M. J., & Martignetti, J. A. (2001). Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. *Am J Hum Genet*, *69*(5), 1033-1045. <https://doi.org/10.1086/324267>
- Hellmark, T., Burkhardt, H., & Wieslander, J. (1999). Goodpasture disease. Characterization of a single conformational epitope as the target of pathogenic autoantibodies. *J Biol Chem*, *274*(36), 25862-25868. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25862>
- Hertz, J. M., Thomassen, M., Storey, H., & Flinter, F. (2015). Clinical utility gene card for: Alport syndrome - update 2014. *Eur J Hum Genet*, *23*(9). <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.254>
- Hudson, B. G. (2004). The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. *J Am Soc Nephrol*, *15*(10), 2514-2527. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000141462.00630.76>
- Jais, J. P., Knebelmann, B., Giatras, I., De Marchi, M., Rizzoni, G., Renieri, A., Weber, M., Gross, O., Netzer, K. O., Flinter, F., Pirson, Y., Dahan, K., Wieslander, J., Persson, U., Tryggvason, K., Martin, P., Hertz, J. M., Schroder, C., Sanak, M., . . . Gubler, M. C. (2003). X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls

- and women belonging to 195 families: a "European Community Alport Syndrome Concerted Action" study. *J Am Soc Nephrol*, 14(10), 2603-2610. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000090034.71205.74>
- Jais, J. P., Knebelmann, B., Giatras, I., Marchi, M., Rizzoni, G., Renieri, A., Weber, M., Gross, O., Netzer, K. O., Flinter, F., Pirson, Y., Verellen, C., Wieslander, J., Persson, U., Tryggvason, K., Martin, P., Hertz, J. M., Schroder, C., Sanak, M., . . . Gubler, M. C. (2000). X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype- phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol*, 11(4), 649-657. <https://doi.org/10.1681/ASN.V114649>
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 3(6), 422-433. <https://doi.org/10.1038/nrc1094>
- Kamiyoshi, N., Nozu, K., Fu, X. J., Morisada, N., Nozu, Y., Ye, M. J., Imafuku, A., Miura, K., Yamamura, T., Minamikawa, S., Shono, A., Ninchoji, T., Morioka, I., Nakanishi, K., Yoshikawa, N., Kaito, H., & Iijima, K. (2016). Genetic, Clinical, and Pathologic Backgrounds of Patients with Autosomal Dominant Alport Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*, 11(8), 1441-1449. <https://doi.org/10.2215/CJN.01000116>
- Kaplan, S., Pinar, G., Kaplan, B., Aslantekin, F., Karabulut, E., Ayar, B., & Dilmen, U. (2016). The Prevalence of Consanguineous Marriages and Affecting Factors in Turkey: A National Survey. *J Biosoc Sci*, 48(5), 616-630. <https://doi.org/10.1017/S0021932016000055>
- Kashtan, C. E. (1999). Alport syndrome. An inherited disorder of renal, ocular, and cochlear basement membranes. *Medicine (Baltimore)*, 78(5), 338-360. <https://doi.org/10.1097/00005792-199909000-00005>
- Kashtan, C. E. (2004). Diagnosis of Alport syndrome. *Kidney Int*, 66(3), 1290-1291; author reply 1291. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.884.6.x>
- Kashtan, C. E. (2021). Alport Syndrome: Achieving Early Diagnosis and Treatment. *Am J Kidney Dis*, 77(2), 272-279. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2020.03.026>
- Kashtan, C. E., Ding, J., Garosi, G., Heidet, L., Massella, L., Nakanishi, K., Nozu, K., Renieri, A., Rheault, M., Wang, F., & Gross, O. (2018). Alport syndrome: a unified classification of genetic disorders of collagen IV alpha345: a position paper of the Alport Syndrome Classification Working Group. *Kidney Int*, 93(5), 1045-1051. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.12.018>
- Kashtan, C. E., & Gross, O. (2021). Clinical practice recommendations for the diagnosis and management of Alport syndrome in children, adolescents, and young adults-an update for 2020. *Pediatr Nephrol*, 36(3), 711-719. <https://doi.org/10.1007/s00467-020-04819-6>
- Kashtan, C. E., Segal, Y., Flinter, F., Mankanjuola, D., Gan, J. S., & Watnick, T. (2010). Aortic abnormalities in males with Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 25(11), 3554-3560. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq271>

- Kim, V. N., & Nam, J. W. (2006). Genomics of microRNA. *Trends Genet*, 22(3), 165-173. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.01.003>
- Koç, A., Bora, E., Cinleti, T., Yıldız, G., Bayram, M. T., Bozkaya, Ö. G., & Ulgenalp, A. (2019). Initial Next-Generation Sequencing NGS Results of Alport Syndrome. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, 3(3), 165-169. <https://doi.org/10.30621/jbachs.2019.719>
- Koepke, M. L., Weber, M., Schulze-Lohoff, E., Beirowski, B., Segerer, S., & Gross, O. (2007). Nephroprotective effect of the HMG-CoA-reductase inhibitor cerivastatin in a mouse model of progressive renal fibrosis in Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 22(4), 1062-1069. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl810>
- Kruegel, J., Rubel, D., & Gross, O. (2013). Alport syndrome--insights from basic and clinical research. *Nat Rev Nephrol*, 9(3), 170-178. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2012.259>
- Kuebler, B., Aran, B., Miquel-Serra, L., Munoz, Y., Ars, E., Bullich, G., Furlano, M., Torra, R., Marti, M., Veiga, A., & Raya, A. (2017a). Generation of integration-free induced pluripotent stem cell lines derived from two patients with X-linked Alport syndrome (XLAS). *Stem Cell Res*, 25, 291-295. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.08.019>
- Kuebler, B., Aran, B., Miquel-Serra, L., Munoz, Y., Ars, E., Bullich, G., Furlano, M., Torra, R., Marti, M., Veiga, A., & Raya, A. (2017b). Integration-free induced pluripotent stem cells derived from a patient with autosomal recessive Alport syndrome (ARAS). *Stem Cell Res*, 25, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.08.021>
- Lee, J. M., Nozu, K., Choi, D. E., Kang, H. G., Ha, I. S., & Cheong, H. I. (2019). Features of Autosomal Recessive Alport Syndrome: A Systematic Review. *J Clin Med*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/jcm8020178>
- Legius, E., Proesmans, W., Van Damme, B., Geboes, K., Lerut, T., & Eggermont, E. (1990). Muscular hypertrophy of the oesophagus and "Alport-like" glomerular lesions in a boy. *Eur J Pediatr*, 149(9), 623-627. <https://doi.org/10.1007/BF02034748>
- Lemmink, H. H., Schroder, C. H., Monnens, L. A., & Smeets, H. J. (1997). The clinical spectrum of type IV collagen mutations. *Hum Mutat*, 9(6), 477-499. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1997\)9:6<477::AID-HUMU1>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1997)9:6<477::AID-HUMU1>3.0.CO;2-#)
- Li, H., Zhao, X., Ma, K., Cao, Y., Zhou, H., Ping, Y., Shao, C., Xie, J., & Liu, W. (2017). Applying massively parallel sequencing to paternity testing on the Ion Torrent Personal Genome Machine. *Forensic Sci Int Genet*, 31, 155-159. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.09.007>
- Liu, Y. B., Tan, S. J., Sun, Z. Y., Li, X., Huang, B. Y., & Hu, Q. M. (2008). Clear lens phacoemulsification with continuous curvilinear capsulorhexis and foldable intraocular lens implantation for the treatment of a patient with bilateral anterior lenticonus due to Alport syndrome. *J Int Med Res*, 36(6), 1440-1444. <https://doi.org/10.1177/147323000803600634>

- Loman, N. J., Misra, R. V., Dallman, T. J., Constantinidou, C., Gharbia, S. E., Wain, J., & Pallen, M. J. (2012). Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*, *30*(5), 434-439. <https://doi.org/10.1038/nbt.2198>
- Lyons, O. T., St John, E. R., Morales, J. P., Chan, Y. C., & Taylor, P. R. (2007). Ruptured thoracoabdominal aortic aneurysm in a renal transplant patient with Alport's syndrome. *Ann Vasc Surg*, *21*(6), 816-818. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2007.06.004>
- Malone, A. F., Phelan, P. J., Hall, G., Cetincelik, U., Homstad, A., Alonso, A. S., Jiang, R., Lindsey, T. B., Wu, G., Sparks, M. A., Smith, S. R., Webb, N. J., Kalra, P. A., Adeyemo, A. A., Shaw, A. S., Conlon, P. J., Jennette, J. C., Howell, D. N., Winn, M. P., & Gbadegesin, R. A. (2014). Rare hereditary COL4A3/COL4A4 variants may be mistaken for familial focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*, *86*(6), 1253-1259. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.305>
- Marcocci, E., Uliana, V., Bruttini, M., Artuso, R., Silengo, M. C., Zerial, M., Bergesio, F., Amoroso, A., Savoldi, S., Pennesi, M., Giachino, D., Rombola, G., Fogazzi, G. B., Rosatelli, C., Martinhago, C. D., Carmellini, M., Mancini, R., Di Costanzo, G., Longo, I., . . . Mari, F. (2009). Autosomal dominant Alport syndrome: molecular analysis of the COL4A4 gene and clinical outcome. *Nephrol Dial Transplant*, *24*(5), 1464-1471. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn681>
- Mardis, E. R. (2013). Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, *6*, 287-303. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062012-092628>
- Matthaiou, A., Poulli, T., & Deltas, C. (2020). Prevalence of clinical, pathological and molecular features of glomerular basement membrane nephropathy caused by COL4A3 or COL4A4 mutations: a systematic review. *Clin Kidney J*, *13*(6), 1025-1036. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfz176>
- Meehan, D. T., Delimont, D., Cheung, L., Zallocchi, M., Sansom, S. C., Holzclaw, J. D., Rao, V., & Cosgrove, D. (2009). Biomechanical strain causes maladaptive gene regulation, contributing to Alport glomerular disease. *Kidney Int*, *76*(9), 968-976. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.324>
- Merchant, S. N., Burgess, B. J., Adams, J. C., Kashtan, C. E., Gregory, M. C., Santi, P. A., Colvin, R., Collins, B., & Nadol, J. B., Jr. (2004). Temporal bone histopathology in alport syndrome. *Laryngoscope*, *114*(9), 1609-1618. <https://doi.org/10.1097/00005537-200409000-00020>
- Mochizuki, T., Lemmink, H. H., Mariyama, M., Antignac, C., Gubler, M. C., Pirson, Y., Verellen-Dumoulin, C., Chan, B., Schroder, C. H., Smeets, H. J., & et al. (1994). Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet*, *8*(1), 77-81. <https://doi.org/10.1038/ng0994-77>
- Momota, R., Sugimoto, M., Oohashi, T., Kigasawa, K., Yoshioka, H., & Ninomiya, Y. (1998). Two genes, COL4A3 and COL4A4 coding for the human

- alpha3(IV) and alpha4(IV) collagen chains are arranged head-to-head on chromosome 2q36. *FEBS Lett*, 424(1-2), 11-16. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00128-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00128-8)
- Moriniere, V., Dahan, K., Hilbert, P., Lison, M., Lebbah, S., Topa, A., Bole-Feysot, C., Pruvost, S., Nitschke, P., Plaisier, E., Knebelmann, B., Macher, M. A., Noel, L. H., Gubler, M. C., Antignac, C., & Heidet, L. (2014). Improving mutation screening in familial hematuric nephropathies through next generation sequencing. *J Am Soc Nephrol*, 25(12), 2740-2751. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013080912>
- Mothes, H., Heidet, L., Arrondel, C., Richter, K. K., Thiele, M., Patzer, L., Sado, Y., Gubler, M. C., Antignac, C., & Scheele, J. (2002). Alport syndrome associated with diffuse leiomyomatosis: COL4A5-COL4A6 deletion associated with a mild form of Alport nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 17(1), 70-74. <https://doi.org/10.1093/ndt/17.1.70>
- Nijhuis, W. H., Eastwood, D. M., Allgrove, J., Hvid, I., Weinans, H. H., Bank, R. A., & Sakkars, R. J. (2019). Current concepts in osteogenesis imperfecta: bone structure, biomechanics and medical management. *J Child Orthop*, 13(1), 1-11. <https://doi.org/10.1302/1863-2548.13.180190>
- Nozu, K., Nakanishi, K., Abe, Y., Udagawa, T., Okada, S., Okamoto, T., Kaito, H., Kanemoto, K., Kobayashi, A., Tanaka, E., Tanaka, K., Hama, T., Fujimaru, R., Miwa, S., Yamamura, T., Yamamura, N., Horinouchi, T., Minamikawa, S., Nagata, M., & Iijima, K. (2019). A review of clinical characteristics and genetic backgrounds in Alport syndrome. *Clin Exp Nephrol*, 23(2), 158-168. <https://doi.org/10.1007/s10157-018-1629-4>
- Ohkubo, S., Takeda, H., Higashide, T., Ito, M., Sakurai, M., Shirao, Y., Yanagida, T., Oda, Y., & Sado, Y. (2003). Immunohistochemical and molecular genetic evidence for type IV collagen alpha5 chain abnormality in the anterior lenticonus associated with Alport syndrome. *Arch Ophthalmol*, 121(6), 846-850. <https://doi.org/10.1001/archophth.121.6.846>
- Oka, M., Nozu, K., Kaito, H., Fu, X. J., Nakanishi, K., Hashimura, Y., Morisada, N., Yan, K., Matsuo, M., Yoshikawa, N., Vorechovsky, I., & Iijima, K. (2014). Natural history of genetically proven autosomal recessive Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*, 29(9), 1535-1544. <https://doi.org/10.1007/s00467-014-2797-4>
- Ozdemir, G., Gulhan, B., Atayar, E., Saygili, S., Soylemezoglu, O., Ozcakar, Z. B., Eroglu, F. K., Candan, C., Demir, B. K., Soylu, A., Yuksel, S., Alpay, H., Agbas, A., Duzova, A., Hayran, M., Ozaltin, F., & Topaloglu, R. (2020). COL4A3 mutation is an independent risk factor for poor prognosis in children with Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*, 35(10), 1941-1952. <https://doi.org/10.1007/s00467-020-04574-8>
- Pabinger, S., Dander, A., Fischer, M., Snajder, R., Sperk, M., Efremova, M., Krabichler, B., Speicher, M. R., Zschocke, J., & Trajanoski, Z. (2014). A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. *Brief Bioinform*, 15(2), 256-278. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs086>

- Pecci, A., Panza, E., Pujol-Moix, N., Klersy, C., Di Bari, F., Bozzi, V., Gresele, P., Lethagen, S., Fabris, F., Dufour, C., Granata, A., Doubek, M., Pecoraro, C., Koivisto, P. A., Heller, P. G., Iolascon, A., Alvisi, P., Schwabe, D., De Candia, E., . . . Savoia, A. (2008). Position of nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA) mutations predicts the natural history of MYH9-related disease. *Hum Mutat*, *29*(3), 409-417. <https://doi.org/10.1002/humu.20661>
- Pergola, P. E., Raskin, P., Toto, R. D., Meyer, C. J., Huff, J. W., Grossman, E. B., Krauth, M., Ruiz, S., Audhya, P., Christ-Schmidt, H., Wittes, J., Warnock, D. G., & Investigators, B. S. (2011). Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, *365*(4), 327-336. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1105351>
- Petersen, B. S., Fredrich, B., Hoepfner, M. P., Ellinghaus, D., & Franke, A. (2017). Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genet*, *18*(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0479-5>
- Pochet, J. M., Bobrie, G., Landais, P., Goldfarb, B., & Grunfeld, J. P. (1989). Renal prognosis in Alport's and related syndromes: influence of the mode of inheritance. *Nephrol Dial Transplant*, *4*(12), 1016-1021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2517321>
- Proesmans, W., Knockaert, H., & Trouet, D. (2000). Enalapril in paediatric patients with Alport syndrome: 2 years' experience. *Eur J Pediatr*, *159*(6), 430-433. <https://doi.org/10.1007/s004310051301>
- Rhys, C., Snyers, B., & Pirson, Y. (1997). Recurrent corneal erosion associated with Alport's syndrome. Rapid communication. *Kidney Int*, *52*(1), 208-211. <https://doi.org/10.1038/ki.1997.321>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehms, H. L., & Committee, A. L. Q. A. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, *17*(5), 405-424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Rizzo, J. M., & Buck, M. J. (2012). Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)*, *5*(7), 887-900. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0432>
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., . . . Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, *475*(7356), 348-352. <https://doi.org/10.1038/nature10242>
- Saika, S., Hayashi, Y., Miyamoto, T., Yoshitomi, T., & Ohnishi, Y. (2002). Multiple retinal holes in the macular region: a case report. *Graefes Arch Clin Exp*

- Ophthalmol*, 240(7), 578-579. <https://doi.org/10.1007/s00417-002-0471-1>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*, 24, 104-108. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1422003>
- Savige, J., Ariani, F., Mari, F., Bruttini, M., Renieri, A., Gross, O., Deltas, C., Flinter, F., Ding, J., Gale, D. P., Nagel, M., Yau, M., Shagam, L., Torra, R., Ars, E., Hoefele, J., Garosi, G., & Storey, H. (2019). Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*, 34(7), 1175-1189. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-3985-4>
- Savige, J., Gregory, M., Gross, O., Kashtan, C., Ding, J., & Flinter, F. (2013). Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 24(3), 364-375. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012020148>
- Savige, J., Sheth, S., Leys, A., Nicholson, A., Mack, H. G., & Colville, D. (2015). Ocular features in Alport syndrome: pathogenesis and clinical significance. *Clin J Am Soc Nephrol*, 10(4), 703-709. <https://doi.org/10.2215/CJN.10581014>
- Savige, J., Storey, H., Watson, E., Hertz, J. M., Deltas, C., Renieri, A., Mari, F., Hilbert, P., Plevova, P., Byers, P., Cerkauskaite, A., Gregory, M., Cerkauskiene, R., Ljubanovic, D. G., Becherucci, F., Errichiello, C., Massella, L., Aiello, V., Lennon, R., . . . Lipska-Zietkiewicz, B. S. (2021). Consensus statement on standards and guidelines for the molecular diagnostics of Alport syndrome: refining the ACMG criteria. *Eur J Hum Genet*, 29(8), 1186-1197. <https://doi.org/10.1038/s41431-021-00858-1>
- Schadt, E. E., Turner, S., & Kasarskis, A. (2010). A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet*, 19(R2), R227-240. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq416>
- Shah, S. N., & Weinberg, D. V. (2010). Giant macular hole in Alport syndrome. *Ophthalmic Genet*, 31(2), 94-97. <https://doi.org/10.3109/13816811003767128>
- Shaw, E. A., Colville, D., Wang, Y. Y., Zhang, K. W., Dagher, H., Fassett, R., Guymer, R., & Savage, J. (2007). Characterization of the peripheral retinopathy in X-linked and autosomal recessive Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 22(1), 104-108. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl607>
- Smith, M. (2017). DNA Sequence Analysis in Clinical Medicine, Proceeding Cautiously. *Front Mol Biosci*, 4, 24. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00024>
- Storey, H., Savage, J., Sivakumar, V., Abbs, S., & Flinter, F. A. (2013). COL4A3/COL4A4 mutations and features in individuals with autosomal

- recessive Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 24(12), 1945-1954. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012100985>
- Tan, R., Colville, D., Wang, Y. Y., Rigby, L., & Savige, J. (2010). Alport retinopathy results from "severe" COL4A5 mutations and predicts early renal failure. *Clin J Am Soc Nephrol*, 5(1), 34-38. <https://doi.org/10.2215/CJN.01030209>
- Thorvaldsdottir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*, 14(2), 178-192. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>
- Torra, R., & Furlano, M. (2019). New therapeutic options for Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 34(8), 1272-1279. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfz131>
- Tucker, T., Marra, M., & Friedman, J. M. (2009). Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am J Hum Genet*, 85(2), 142-154. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.06.022>
- Ulahannan, D., Kovac, M. B., Mulholland, P. J., Cazier, J. B., & Tomlinson, I. (2013). Technical and implementation issues in using next-generation sequencing of cancers in clinical practice. *Br J Cancer*, 109(4), 827-835. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.416>
- Uliana, V., Marcocci, E., Mucciolo, M., Meloni, I., Izzi, C., Manno, C., Bruttini, M., Mari, F., Scolari, F., Renieri, A., & Salviati, L. (2011). Alport syndrome and leiomyomatosis: the first deletion extending beyond COL4A6 intron 2. *Pediatr Nephrol*, 26(5), 717-724. <https://doi.org/10.1007/s00467-010-1693-9>
- Uzak, A. S., Tokgoz, B., Dundar, M., & Tekin, M. (2013). A novel COL4A3 mutation causes autosomal-recessive Alport syndrome in a large Turkish family. *Genet Test Mol Biomarkers*, 17(3), 260-264. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2012.0340>
- Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem*, 55(4), 641-658. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>
- Wang, Y., Sivakumar, V., Mohammad, M., Colville, D., Storey, H., Flinter, F., Dagher, H., & Savige, J. (2014). Clinical and genetic features in autosomal recessive and X-linked Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*, 29(3), 391-396. <https://doi.org/10.1007/s00467-013-2643-0>
- Wieslander, J., Langeveld, J., Butkowski, R., Jodlowski, M., Noelken, M., & Hudson, B. G. (1985). Physical and immunochemical studies of the globular domain of type IV collagen. Cryptic properties of the Goodpasture antigen. *J Biol Chem*, 260(14), 8564-8570. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2409091>
- Wuhl, E., Mehls, O., Schaefer, F., & Group, E. T. (2004). Antihypertensive and antiproteinuric efficacy of ramipril in children with chronic renal failure.

- Kidney Int*, 66(2), 768-776. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00802.x>
- Yang, Y., Xie, B., & Yan, J. (2014). Application of next-generation sequencing technology in forensic science. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 12(5), 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2014.09.001>
- Yokota, T., Omachi, K., Suico, M. A., Kamura, M., Kojima, H., Fukuda, R., Motomura, K., Teramoto, K., Kaseda, S., Kuwazuru, J., Takeo, T., Nakagata, N., Shuto, T., & Kai, H. (2018). STAT3 inhibition attenuates the progressive phenotypes of Alport syndrome mouse model. *Nephrol Dial Transplant*, 33(2), 214-223. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfx246>
- Yurchenco, P. D. (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004911>
- Zhang, Y., & Ding, J. (2018). Renal, auricular, and ocular outcomes of Alport syndrome and their current management. *Pediatr Nephrol*, 33(8), 1309-1316. <https://doi.org/10.1007/s00467-017-3784-3>
- Zhao, C., Wang, F., Zhang, Y., Wen, Y., Su, Y., Zhang, C., Sui, R., Xu, F., Ding, J., & Dong, F. (2012). A novel splice site mutation in the COL4A5 gene in a Chinese female patient with rare ocular abnormalities. *Mol Vis*, 18, 2205-2212. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919268>
- Zhao, X., Chen, C., Wei, Y., Zhao, G., Liu, L., Wang, C., Zhang, J., & Kong, X. (2019). Novel mutations of COL4A3, COL4A4, and COL4A5 genes in Chinese patients with Alport Syndrome using next generation sequence technique. *Mol Genet Genomic Med*, 7(6), e653. <https://doi.org/10.1002/mgg3.653>
- Zhou, J., Hostikka, S. L., Chow, L. T., & Tryggvason, K. (1991). Characterization of the 3' half of the human type IV collagen alpha 5 gene that is affected in the Alport syndrome. *Genomics*, 9(1), 1-9. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90214-y](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90214-y)

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Bildiriler

1. Cüneyd Yavaş, Nehir Özdemir Özgentürk, Cemal Ün, X Kromozomu Kalıtlı Alport Sendromunda Genotip-Fenotip Korelasyonu. 7th International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences, September 3-4, 2021.

Makaleler

1. Cüneyd Yavaş, Cemal Ün, Evrim Çelebi, Alper Gezdirici, Mustafa Doğan, Ezgi Gökpınar İli, Tunay Doğan, Nehir Özdemir Özgentürk. “Whole Exome Sequencing (WES) Results of 50 Patients with Chronic Kidney Diseases: A Perspective of Alport Syndrome”. Revista da Associação Médica Brasileira (SCI-E kapsamında uluslararası dergi-kabul almış basım aşamasında)

