

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOCUKLUK DÖNEMİ STEROİDE DİRENÇLİ
NEFROTİK SENDROMA SEBEP OLAN
YENİ GENLERİN BULUNMASI**

Dr. Buğsu ÖVÜNÇ

**Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2012**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇOCUKLUK DÖNEMİ STEROİDE DİRENÇLİ
NEFROTİK SENDROMA SEBEP OLAN
YENİ GENLERİN BULUNMASI**

Dr. Buğsu ÖVÜNÇ

**Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Engin YILMAZ**

**ANKARA
2012**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Meral ÖZGÜÇ
Hacettepe Üniversitesi

Danışman:

Prof. Dr. Engin YILMAZ
Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Nurten AKARSU
Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Pervin DİNÇER
Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Ferda PERÇİN
Gazi Üniversitesi

ONAY

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ve tez çalışmamda bana yol gösteren ve akıl hocalığı yapan Prof. Dr. Engin Yılmaz ve Prof. Dr. Friedhelm Hildebrant'a; değerli katkıları ve yorumları için tez izleme komitesi üyeleri hocalarım Prof. Dr. Meral Özgüç ve Prof. Dr. Nurten Akarsu'ya; sürekli destek ve ilgisini benden esirgemeyen hocam Prof. Dr. Ahmet Kart'a; doktora çalışmalarımın bir bölümünü yurtdışında yapabilmem için tüm anlayışını ve desteğini gösteren Sağlık Bilimleri Eski Enstitü Müdürü Prof. Dr. Hakan Orer'e ve Tıp Bilim Doktoru Bütünleşik Programı Koordinatör Yardımcısı Prof. Dr. Alev Özon'a; Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görev yapan tüm hocalarıma ve tez çalışmalarımı yurtdışında yürütürken bölümle aramda köprü kuran ve benden yardımlarını esirgemeyen Dr. Nilgün Çetin ve Dr. Hülya Gündeşli'ye; Michigan Üniversitesi Pediatrik Nefroloji Laboratuvarların görev yapan ve kendisinden çok şey öğrendiğim Dr. Edgar Otto, Dr. Moumita Chaki, Dr. Saskia Heeringa ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Uzaktadayken benden manevi desteklerini esirgemeyen dostlarım Sevcan Yeşiltaş, Uzm. Dr. Birce Dilge Taşkın, Ceren Tanış Güner, Aysu Erdoğan, Doruk Cinoğlu, Işıl Irmak ve geniş aileme en içten teşekkürlerimi sunarım. Bana çalışmalarımı yaparken ve tezimi yazarken can yoldaşlığı yapan köpeğim Dolma'ya teşekkür ederim.

Tezimi; karşılaştığım her güçlüğün üzerinden gelmemde bana destek olan, benim isteklerime ulaşmam için her zaman fedakarlıkta bulunan, aramızdaki uzaklıkları sabırla karşılayan, hayattaki en değerli varlıklarım olan annem Yasemin Övünç ve babam Prof. Dr. Kenan Övünç'e sonsuz sevgi ve minnetlerimle adıyorum.

ÖZET

Övünç, B. Çocukluk dönemi steroide dirençli nefrotik sendroma sebep olan yeni genlerin bulunması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2012. Steroide dirençli nefrotik sendrom (SDNS) nadir bir hastalık olmakla birlikte çocukluk ve genç erişkinlik döneminde son dönem böbrek yetmezliğinin en sık ikinci sebebidir. Ancak genetik heterojenitenin varlığı ve hastalığın nadir gözlenmesi (<%1), yeni bir genin bulunmasına ciddi sınırlamalar getirmektedir. Tez çalışmasında, homozigotluk haritalaması tekniği (*total genome homozygosity mapping*) ile eksom saptama (*whole human exome capture*) ve yüksek ölçekli dizileme (*massively parallel re-sequencing*) tekniklerinin birleştirildiği bir yaklaşım ile yeni genlerin bulunması hedeflenmiştir. Hasta grubunu oluşturan 2056 aile, SDNS'e yüksek oranda sebep olduğu bilinen *NPHS1*, *NPHS2*, *LAMB2*, *PLCE1* ve *WT*'deki mutasyonlar açısından DNA dizi analizi ile taranmış ve 310 ailenin hastalık sebebi bu genlerdeki bir mutasyonla aydınlatılmıştır. Geri kalan 1746 aile arasından seçilen ve ebeveynler arasında akrabalık olduğu bilinen 85 aile homozigotluk haritalaması tekniği kullanılarak *Affymetrix 250K (Styl)* SNP çip ile taranmıştır. Homozigotluk analizlerinde hastalıktan etkilenen iki veya daha fazla çocuğun olmasının, hastalığa sebep olduğu düşünülen geni içeren homozigot bölgenin daraltılmasına yardımcı olması nedeniyle, bu 85 aile arasından birden fazla hastalıktan etkilenen kardeşin olduğu 19 aile seçilmiştir. Bu 19 aile arasından bir aile (A 2410) etnik kökeni, klinik bulguları ve tedaviye cevap özellikleri açısından dikkat çekmiş ve eksom saptama ve yüksek ölçekli dizileme ile analiz edilmiştir. A2410-21 ve A2410-22 kardeşleri için parametrik olmayan LOD değerleri, iki kardeş birlikte hesaplanmış ve kromozom 3, 10, 14, 17, 21 ve 22'de ortak atadan kalıtılan homozigotluğu işaret eden cZLR *peak*'leri bulunmuştur. Eksom saptama ve yüksek ölçekli dizileme, referans diziden farklı 1968 varyant göstermiştir. Sonuçlar veri bankalarıyla karşılaştırıldığında bu varyantların 48 tanesinin SNP olmadığı saptanmıştır. Bu 48 varyant arasından 11 tanesinin sinonim olmadığı ve homozigot segmentlere yerleşmiş olduğu bulunmuştur. Bu varyantlardan sadece bir tanesi insersiyon/delesyon varyasyonudur. Bu sayede *CUBN* (Cubilin) geninin 53'üncü eksonunda bir bazçiftlik homozigot delesyonun (c.8355delA) çerçeve kaymasına neden olarak kodlanan proteinin erken sonlandırılmasından (p.S2785fsX19) sorumlu olduğu bulunmuştur. DNA dizi analiziyle mutasyonun hastalıktan etkilenen kardeşlerde homozigot; ebeveynlerinde ise heterozigot olarak varlığı gösterilmiştir. 1000 Genom Projesi veri bankasıyla karşılaştırılarak mutasyonun kontrol bireylerde olmadığı görülmüştür. Ayrıca Mısır popülasyonuna etnik olarak eş olan sağlıklı 92 Türk bireyi kontrol amacıyla DNA dizi analizi ile incelenmiş ve bu bireylerde mutasyon bulunmamıştır.

Anahtar kelimeler: Nefrotik sendrom, *CUBN*, homozigotluk haritalaması, eksom saptama, yüksek ölçekli dizileme

ABSTRACT

Övünç, B. Identification of novel genes causing steroid resistant nephrotic syndrome of childhood. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2012. Steroid resistant nephrotic syndrome (SRNS), despite being a rare disease, is the second most common cause of end stage kidney failure in childhood and early adulthood. However the heterogeneity and rarity (<1%) of disease causing genes cause significant limitations in identification of a new gene. In this thesis work, identification of a novel gene is aimed via a new approach which combines total genome homozygosity mapping technique with whole human exome capture and massively parallel re-sequencing techniques. 2056 families consisting the cohort were screened via direct DNA sequencing for mutations in *NPHS1*, *NPHS2*, *LAMB2*, *PLCE1* and *WT1* genes that are known to cause SRNS at a high proportion and the cause of SRNS is identified in 310 families. Out of the remaining 1746, 85 families with known parental consanguinity were chosen to be analyzed by total genome homozygosity mapping technique via *Affymetrix 250K (Styl)* SNP chip. In homozygosity analysis, the presence of two or more siblings affected by the disease aids in the narrowing of the homozygous segments that are believed to harbor the disease causing gene, therefore 19 families that have multiple affected siblings were chosen among 85 families. One family (A2410) drew attention based on ethnic roots, clinical properties and response to treatment properties amongst 19 families and analyzed with whole human exome capture and massively paralel re-sequencing. Non parametric LOD scores were calculated together for siblings A2410-21 and A2410-22 and cZLR peaks pointing homozygosity by descent were found on chromosomes 3, 10, 14, 17, 21 and 22. Whole human exome capture and massively paralel re-sequencing showed 1968 variants from reference sequence and 48 of them were found not to be SNP's by comparing to the databases. 11 out of these 48 were found to be non-synonymous changes and harboring in the homozygous segments. Only one of these variants was an insertion/deletion variation. Therefore one basepair homozygous deletion in *CUBN* (Cubilin) gene exon 53 (c.8355delA) was found that leads to early termination of protein (p.S2785fsX19) via causing a frameshift mutation. The presence of the mutation in homozygous state in affected siblings and in heterozygous state in the parents were shown by direct DNA sequencing. The absence of the mutation in healthy controls was verified by comparison with 1000 genome database. Also the mutation was not found when 92 healthy Turkish control individuals that are ethnic matching to Egyptian population were analyzed by DNA sequencing.

Key Words: Nephrotic syndrome, *CUBN*, total genome homozygosity mapping, whole human exome capture, massively parallel re-sequencing

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| ÖZET | v |
| ABSTRACT | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | x |
| TABLolar DİZİNİ | xi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Çocukluk Dönemi Steroide Dirençli Nefrotik Sendrom | 3 |
| 2.2. Çocukluk Dönemi Steroide Dirençli Nefrotik Sendroma Neden Olan Genlerin Araştırılması | 7 |
| 2.2.1. Homozigotluk Haritalaması | 7 |
| 2.2.2. SDNS'e Neden Olan Yeni Genlerin Bulunmasında Homozigotluk Haritalaması Tekniğinin Uygunluğu | 10 |
| 2.2.3. Eksom Saptama ve Yüksek Ölçekli Dizileme | 11 |
| 2.2.4. Homozigotluk Haritalaması ile Eksom Saptama ve Yüksek Ölçekli Dizileme Verilerinin Birleştirilmesi | 12 |
| 2.3. Amaç | 13 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 14 |
| 3.1. Gereçler | 14 |
| 3.1.1. Araştırma Gurubu | 14 |
| 3.1.2. Mutasyon Analizi | 14 |
| 3.1.3. Homozigotluk Haritalaması | 15 |
| 3.1.4. Eksom Saptama ve Yüksek Ölçekli Dizileme | 16 |
| 3.2. Yöntemler | 17 |
| 3.2.1. Ailelerde Mutasyon Analizi Yapılacak Genlerin Belirlenmesi | 17 |
| 3.2.2. Mutasyon Analizi | 23 |
| 3.2.3. Homozigotluk Haritalaması ile İncelenecek Ailelerin Belirlenmesi | 27 |

| | |
|--|----|
| 3.2.4.Homozigotluk Haritalaması | 27 |
| 3.2.5.Eksom Saptama Tekniğiyle İncelenecek Ailelerin Belirlenmesi | 29 |
| 3.2.6.Eksom Saptama ve Yüksek Ölçekli Dizileme | 31 |
| 4. BULGULAR | 34 |
| 4.1. Mutasyon Analizi | 34 |
| 4.2. Homozigotluk Haritalaması | 38 |
| 4.3. Eksom Saptama ve Yüksek Ölçekli Dizileme | 39 |
| 4.4. Homozigotluk Haritalaması ile Eksom Saptama ve Yüksek Ölçekli Dizileme Verilerinin Birleştirilmesi | 39 |
| 5. TARTIşMA | 54 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 56 |
| KAYNAKLAR | 59 |
| EKLER | |
| EK 1. Klinik Bilgi Formu | |
| EK 2. İngilizce Aydınlatılmış Onam Formu | |
| EK 3. Türkçe Aydınlatılmış Onam Formu | |
| EK 4. NPHS1 Makale | |
| EK 5. CUBN Makale | |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|----------------|---|
| °C | Derece santigrad |
| ACE inhibitors | Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors |
| <i>ACTN4</i> | Actinin- α 4 |
| bç | Baz çifti |
| CCS | Consensus Coding Sequence |
| <i>CD2AP</i> | Cd2-associated protein |
| cZLR | Consistent non-parametric likelihood ratio z-scores |
| DNA | Deoksiribonükleik Asit |
| EDTA | Etilendiamintetraasetik Asit |
| IGS | Imerslund-Grösbeck Syndrome |
| <i>LAMB2</i> | Laminin- β 2 |
| LOD | Logarithm of Odds Ratio |
| <i>NPHS1</i> | Nephrin |
| <i>NPHS2</i> | Podocin |
| NS | Nefrotik Sendrom |
| <i>PLCE1</i> | Phospholipase-C ϵ 1 |
| PZR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| rpm | Rotations per minute |
| SDNS | Steroide Dirençli Nefrotik Sendrom |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism |
| TAE | Tris-asetat EDTA |
| TBE | Tris-borat EDTA |
| <i>TRPC6</i> | Transient receptor potential channel 6 |
| UCSC | University of California, Santa Cruz |
| <i>WT1</i> | Wilms Tumor 1 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| 2.1. Nefrin, Podosin, Aktinin alfa-4, TRPC6, CD2AP, PLCE1, LAMB2'nin podositlerdeki yerleşimi. | 5 |
| 2.2. Ortak atadan kalıtılarak homozigotluk. | 9 |
| 2.3. Pozisyona bağlı klonlama tekniği. | 9 |
| 3.1. Normal glomerül, difüz mezanjiyal glomerüloskleroz ve gestasyonel gelişimi 28 hafta seviyesinde olan glomerüllerin histolojik karşılaştırılması. | 20 |
| 4.1. <i>NPHS1</i> 'de yeni tanımlanan mutasyonlar için hasta bireyin ve sağlıklı kontrol bireyin DNA dizi analizi. | 36 |
| 4.2. A2410-21 ve A2410-22 bireylerinin birlikte hesaplanan parametrik olmayan LOD değerlerinin işaret ettiği homozigot bölgeler. | 40 |
| 4.3. <i>CLC</i> yazılımında <i>CUBN</i> 53'üncü eksonunda bir baz çifti uzunluğundaki homozigot delesyonun görünümü (c.8355 delA). | 49 |
| 4.4. A2410 ailesinde <i>CUBN</i> ekson 53: c.8355delA (p.S2785fsX19) mutasyonu. | 53 |

TABLolar DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|--------------|
| 3.1. <i>NPHS2</i> 'nin çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri. | 17 |
| 3.2. <i>WT1</i> 'in çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri. | 18 |
| 3.3. <i>NPHS1</i> 'in çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri. | 19 |
| 3.4. <i>PLCE1</i> 'in çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri. | 21 |
| 3.5. <i>LAMB2</i> 'nin çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri. | 23 |
| 4.1. <i>NPHS1</i> 'de yeni tanımlanan mutasyonlar. | 35 |
| 4.2. <i>NPHS1</i> 'de yeni tanımlanan yanlış anlamlı mutasyonların evrimsel korunumu. | 36 |
| 4.3. A2410-21 ve A2410-22 bireylerinin birlikte hesaplanması ile bulunan cZLR <i>peak</i> değerleri ile homozigotluk haritalarının karşılaştırılması. | 40 |
| 4.4. A2410-22'nin eksom saptama tekniğiyle incelenmesi ile elde edilen varyantlar arasından homozigotluk haritalaması ile homozigot olduğu gösterilmiş bölgelere filtrelenen varyantlar. | 42 |
| 4.5. <i>CUBN</i> 'in çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri. | 50 |

1. GİRİŞ

Nefrotik sendrom (NS) idrarda protein kaybı ($>4 \text{ mg/m}^2/\text{gün}$), serum albuminin azalması (hipoalbuminemi) ve bunlara bağlı olarak hücreler arası boşluğa sıvı birikimi (ödem) ile karakterize kronik bir böbrek hastalığıdır. İdiopatik NS standart steroid tedavisine cevap verip vermemesine göre steroide duyarlı veya steroide dirençli nefrotik sendrom olarak sınıflandırılır (1).

Steroide dirençli nefrotik sendrom (SDNS) nadir bir hastalık olmakla birlikte çocukluk ve genç erişkinlik döneminde son dönem böbrek yetmezliğinin en sık ikinci sebebidir. Bilinen bir tedavisi yoktur. Hastalık hızla ilerleyerek hastayı yaşamının devamı için diyaliz veya böbrek nakline bağımlı bırakır (1).

SDNS'in primer sebebi (etyolojisi) ve hastalık mekanizması (fizyopatolojisi) yıllardır anlaşılmaya çalışılmakla birlikte halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Klasik olarak immünolojik nedenli olduğu düşünülen hastalığın, geçtiğimiz on yılda nadir bir tek gen hastalığı olduğu gösterilmiştir. Şimdiye kadar çocukluk çağı SDNS'inden yüksek oranda *NPHS1* (2), *NPHS2* (3-5), *LAMB2* (6-7) ve *PLCE1* (8) genlerindeki resesif ve *WT1* (9) genindeki dominant mutasyonların sorumlu olduğu bulunmuştur. Bu genlerdeki resesif mutasyonlar hastalığın bir bölümünü açıklamış olsa da (yaşamın ilk 3 ayında %85; ilk bir yılında %66; ilk bir yılın sonrasında %15-28) çocukluk ve genç erişkinlik SDNS'i halen moleküler olarak büyük ölçüde açıklanamamıştır (10).

Çocukluk ve genç erişkinlik SDNS'ine sebep olan ancak henüz tanımlanmamış birçok genin varlığı homozigotluk haritalaması tekniği (*total genome homozygosity mapping*) ile saptanmıştır (11). Ancak bu genlerin heterojenliği ve hastalığın nadir gözlenmesi ($<1\%$), yeni bir genin bulunmasına ciddi sınırlamalar getirmektedir (11). Bu tez çalışmasında, homozigotluk haritalaması tekniği ile eksom saptama (*whole human exome capture*) ve yüksek ölçekli dizileme (*massively parallel re-sequencing*) tekniklerinin birleştirildiği yeni bir yaklaşım ile yeni genlerin bulunması

hedeflenmiştir. Araştırmanın sonucunda nefrotik sınırdaki proteinürisi olan iki kardeşte, CUBN geninin 53'üncü eksonunda çerçeve kaymasına neden olan bir baz çifti uzunluğunda homozigot bir delesyon bulunmuş (c.8355delA; p.S2785fsX19) ve proteinürinin sebebi olarak yeni bir gen tanımlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Çocukluk Dönemi Steroide Dirençli Nefrotik Sendrom

Nefrotik sendrom (NS) idrarda protein kaybı ($>4\text{mg}/\text{m}^2/\text{gün}$), serum albuminin azalması (hipoalbuminemi) ve buna bağlı olarak hücreler arası boşluğa sıvı birikimi (ödem) ile karakterize kronik bir böbrek hastalığıdır. İdiopatik NS standart steroid tedavisine cevap verip vermemesine göre steroide duyarlı veya steroide dirençli nefrotik sendrom olarak sınıflandırılır (1).

Steroide dirençli nefrotik sendrom (SDNS) nadir bir hastalık olmakla birlikte çocukluk ve genç erişkinlik döneminde son dönem böbrek yetmezliğinin en sık ikinci sebebidir (1). Bilinen bir tedavisi yoktur. Hastalık hızla ilerleyerek hastayı yaşamın devamı için diyaliz veya böbrek nakline bağımlı bırakır.

Klasik olarak immünolojik nedenli bir hastalık olarak tanımlanan SDNS, primer sebebi (etyolojisi) ve hastalık mekanizması (fizyopatolojisi) yıllardır anlaşılmaya çalışılmasına rağmen günümüzde halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak yakın geçmişte resesif kalıtılan *NPHS1* (2), *NPHS2* (3-5), *LAMB2* (6,7), *PLCE1* (8), *SMARCAL1* (12), *COQ2* (13), *PDSS2* (14,15), *COQ6* (16) ve *SCARB2* (17) ile dominant kalıtılan *WT1* (9), *ACTN4* (18), *CD2AP* (19) ve *TRPC6* (20) mutasyonlarının SDNS'e sebep olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasından *WT1* haricinde dominant kalıtılanlar erişkin dönem SDNS'ine sebep olmaktadır. *WT1* mutasyonları ise çocukluk çağı SDNS vakalarının yaklaşık %5'lik bir bölümünü açıklamaktadır (10).

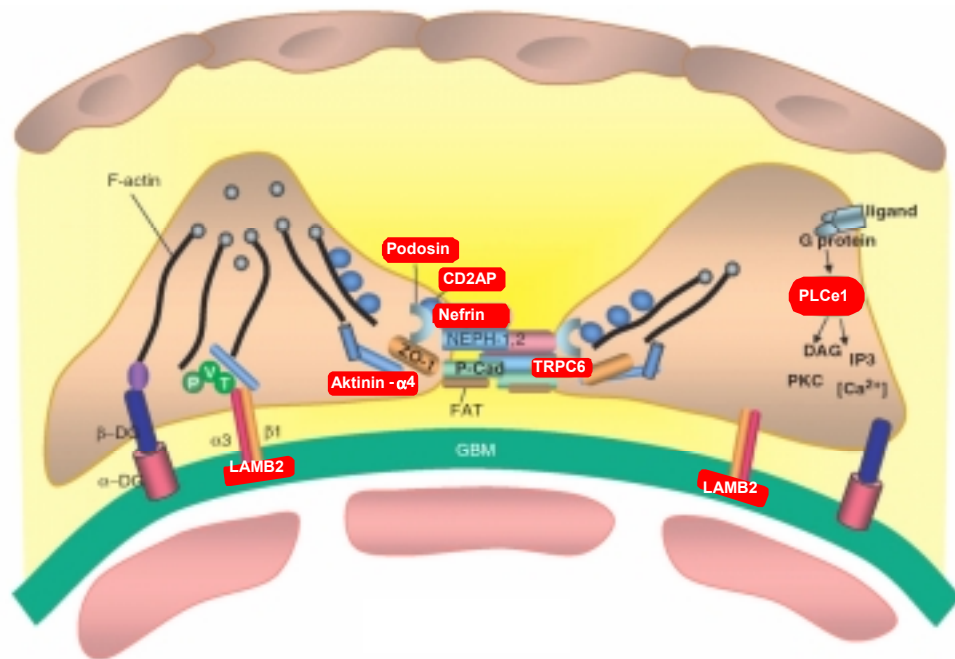
Çocukluk çağı SDNS vakalarının büyük bir bölümü, resesif tek gen mutasyonlarıyla açıklanmaktadır. Yapılan bir çalışmada, yaşamın ilk 3 ayında ortaya çıkan SDNS vakalarının %85'i ve yaşamın ilk yılında ortaya çıkan SDNS vakalarının %66'sı, dört genden birindeki (*NPHS1*, *NPHS2*, *LAMB2* veya *WT1*) mutasyonlarla açıklanabilmiştir (10). Çocukluk çağı SDNS'ine en yüksek oranda (%28) resesif *NPHS2/podosin* mutasyonlarının neden olduğu gösterilmiştir (10). *NPHS1/nephrin* mutasyonları, SDNS fenotipine ek olarak konjenital nefrotik sendroma (prenatal ya da hayatın ilk 3 ayında ortaya çıkan

nefrotik sendrom) (21,22), *LAMB2/laminin-β2* genindeki mutasyonlar SDNS fenotipine ek olarak göz anormalliklerine (6,7) ve *PLCE1/phospholopase-Cε1* genindeki mutasyonlar SDNS fenotipine ek olarak difüz mezanjiyal skleroz fenotipine (8) neden olmaktadır. Yukarıda bahsedilen ve resesif kalıtılan *NPHS1*, *NPHS2*, *LAMB2* ve *PLCE1* genleri haricinde çocukluk çağı SDNS'ine sebep olan diğer resesif genlerdeki mutasyonlar çok nadir olarak görülmekte (<%1) ve oldukça ayırıcı fenotipik özellikler göstermektedir. SDNS fenotipine ek olarak *SMARCAL1* mutasyonu kemik anormallikleri ve immün yetmezlikle seyreden Schimke İmmüno-Osseöz Displazi'sine (12); *COQ2* (13), *PDSS2* (14,15) ve *COQ6* (16) mutasyonları nörolojik bulgular ve duyma kaybı ile seyreden mitokondrial hastalık fenotipine; *SCARB2* (17) mutasyonları myoklonik epilepsi fenotipine neden olmaktadır.

SDNS'e sebep olan genlerin haritalanması ve tanımlanmasının hastalık patogenezi (23-28), tanı ve tedavisinin anlaşılabilmesi üzerinde büyük etkisi olmuştur (29). Moleküler genetik testler sayesinde hastalığın erken tanısı ve klinik çalışmalarda etyolojik sınıflandırılmanın yapılmasında (30-32); genotip-fenotip (33-41) ve genotip-tedaviye cevap (42-46) korelasyonlarının kurulmasında; SDNS tedavisi için yeni moleküler hedeflerin bulunması (47,48), hayvanlarda hastalık modellerinin geliştirilmesi (49-52) ile SDNS tedavisi için yeni ilaç (16,53) geliştirilmesinde önemli katkılar sağlamıştır.

SDNS'e sebep olan genlerin tanımlanması ile glomerüler işlevin temel bileşenleri ortaya çıkarılmıştır. Renal glomerüler kapillerler 3 hücre tabakasından oluşur: pencereci endotel, bazal membran ve podosit epitelyal hücre tabakası. Podositler nöron benzeri hücrelerdir, dallanan hücresel çıkıntıları (primer, sekonder ve tersiyer prosesler) ile glomerüler kapillerin dışını sarar. Tersiyer prosesler (*foot process*), komşu hücrenin tersiyer prosesleriyle bağlantı kurar. Bu bağlantılar glomerüler slit membranı oluşturur. Glomerüler slit membran böbreğin filtrasyon fonksiyonu ve proteinin kanda kalmasının sağlanması için kritik öneme sahiptir. Nefrotik sendromda bu membranın yapısı bozulmuştur. Şekil 2.1'de iki podosit tersiyer prosesi birbirine glomerüler slit membran ile, glomerüler bazal

mambrana ise integrinler ile bağlanmış şekilde görülmektedir. Glomerüler işlevinde kritik öneme sahip olduğu gösterilmiş bileşenler kırmızı renktedir (Nefrin, Podosin, Aktinin alfa-4, TRPC6, CD2AP, PLCE1, LAMB2) (26). Mutasyonları SDNS'e sebep olan bütün gen ürünleri ya podosit slit membran veya onun komşuluğunda ifade edilirler (*NPHS1/nephrin*, *NPHS2/podocin*, *LAMB2/laminin-β2*, *PLCE1/phospholopase-Cε1*, *ACTN4/actinin-α4*, *CD2AP/cd2-associated protein*, *TRPC6/transient receptor potential channel 6*). Bunların glomerüler fonksiyondaki kritik görevleri pozisyona bağlı klonlama ile gösterilmiştir (2,3,6,18-20). SDNS'e sebep olan genlerin bulunması hastalığın fizyopatolojisinin immünolojik kökenli olduğu paradigmasını yıkmış, SDNS'de tedaviye kısmi cevap veren ilaçların (örneğin siklosporin A) aslında glomerüler slit membran sinyal bileşenleri üzerine direkt etki ettikleri gösterilmiştir (24).



Şekil 2.1. Nefrin, Podosin, Aktinin alfa-4, TRPC6, CD2AP, PLCE1, LAMB2'nin podositlerdeki yerleşimi.

SDNS'e sebep olan genlerin tanımlanması, hastalığın tedaviye cevap korelasyonlarının kurulabilmesine imkan sağlamıştır. Örneğin, *NPHS2/podocin* mutasyonu taşıyan nefrotik sendromlu vakaların standart steroid tedavisine dirençli olduğu, ancak böbrek nakli sonrasında hastalığın tekrarlama olasılığının daha düşük olduğu (%8'e kıyasla %30) gösterilmiştir (5). İlginç bir bulgu olarak, *PLCE1* resesif mutasyonuna sahip iki hasta steroid veya siklosporin A tedavisine tam yanıt vermiş, bu bulgu *PLCE1* ile genetik etkileşime giren potansiyel *modifier* genlerin aranmasına imkan sağlamıştır (8).

SDNS'e sebep olan genlerin belirlenmesi, SDNS tedavisi için yeni moleküler hedeflerin bulunması (47,48); hayvanlarda hastalık modellerinin geliştirilmesi (49-52) ile SDNS tedavisi için yeni ilaç geliştirilmesine imkan sağlamıştır (16,53). Resesif hastalık mekanizmasının çalışılması, gen *knockdown/knockout* ile hayvanlarda modelleme imkanı vererek oldukça güçlü bir çalışma yapmaya olanak tanır. Fare ve zebrafish gibi hayvan modelleri yüksek verimli ilaç taramasını ve tedavi için yeni moleküler hedeflerin tanımlanmasını sağlar. Yapılan çalışmalarda zebrafish hastalık modellerinin geliştirilmesi ile SDNS tedavisi için yeni ilaç geliştirilmesi sağlanmıştır.

Yukarıda bahsedildiği gibi SDNS'e sebep olan bir çok gendeki mutasyonun tanımlanması pek çok ilerlemeye neden olduğu halde, SDNS'e sebep olan genlerin bazılarının henüz tanımlanmamış olması hastalığın etyoloji, patogenez, erken tanı ve tedavi imkanlarının geliştirilmesinde önemli bir sorun olarak öne çıkmaktadır.

Çocukluk ve genç erişkinlik SDNS'inin moleküler patolojisi büyük ölçüde açıklanamamış haldedir ve bu oran yaşla birlikte artmaktadır. Resesif mutasyonlar 0-3 ayda ortaya çıkan SDNS'in %85'ini oluştururken bu oran ilk bir yılda %66'ya, hayatın ilk bir yılı sonrasında ise %15 ile %28'lik bir orana düşmektedir (10). Çocukluk ve genç erişkinlik SDNS'ine neden olan ancak henüz ortaya çıkartılamamış yeni genlerin varlığı homozigotluk haritalaması tekniği ile gösterilmiştir (11). Yapılan çalışmada, çocukluk çağı SDNS tanısı konmuş 250 aile homozigotluk haritalaması tekniğiyle incelenmiştir. Bu 250

ailenin 100'ünde (%40) yeni homozigot aday bölgeler olduğu gösterilmiştir. Bu da SDNS'e sebep olan ancak henüz tanımlanmamış en az 20 tane daha genin varlığını işaret etmektedir.

Çocukluk ve genç erişkinlik SDNS'ine neden olan ancak henüz ortaya çıkartılamamış yeni genlerin varlığı bilinmesine rağmen, bu genlerin heterojenliği ve nadir gözlenmesi (<%1), yeni bir genin bulunmasına ciddi sınırlamalar getirmektedir. Protein kodlayan genler insan genomunun sadece %1'ini oluşturmasına rağmen mutasyonların %85'ini barındırmaktadır (54). Bugüne dek sebebi açığa çıkartılmış 2600 Mendel hastalığı arasında, tüm genom ölçekli ilişkilendirme çalışmaları ile tanımlanan sık risk varyantlarının hastalık riskinde sadece küçük bir etkisi olduğu gösterilirken (55,56), Mendel hastalıklarının çoğunun protein kodlayan genom bölgeleri ya da *canonical splice site*'ta olan nadir mutasyonlardan kaynaklandığı gösterilmiştir (54). Ancak genomdaki her bir kodlayan bölgeyi teker teker analiz etmek oldukça zahmetli ve zaman alıcıdır. Bu araştırmalar genomun tüm kodlayan bölgelerinin (eksom) dizilenmesi fikrini hayata geçirmek için yeni bir teknoloji geliştirilmesine fikir vermiştir. Eksom saptama ve yüksek ölçekli dizileme, hedef bölgelerin hibridizasyonunu tüm eksom ölçeğine taşımaktadır. Bu metodun hastalıklara neden olan genlerin bulunmasında önemli bir potansiyeli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (57-61).

SDNS'e sebep olan yeni bir genin tanımlanması, tedavisi mümkün olmayan bu hastalığın etyolojisinin ve fizyopatolojisinin aydınlatılmasına, mekanizmasının açıklığa kavuşmasına, hastalığın taranmasına, erken tanısına, hastalığın tedavisi için moleküler hedeflerin ortaya çıkmasına ve ilaç tedavisi imkanlarının gelişimine yardımcı olacaktır.

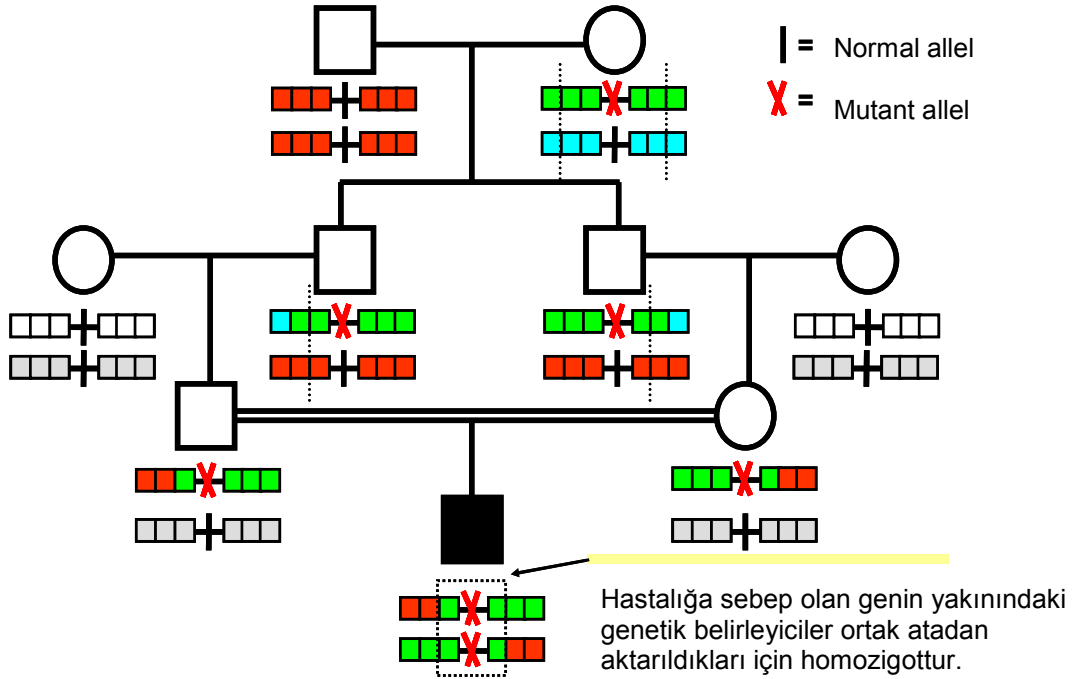
2.2. Çocukluk Dönemi Steroide Dirençli Nefrotik Sendroma Neden Olan Genlerin Araştırılması

2.2.1. Homozigotluk Haritalaması

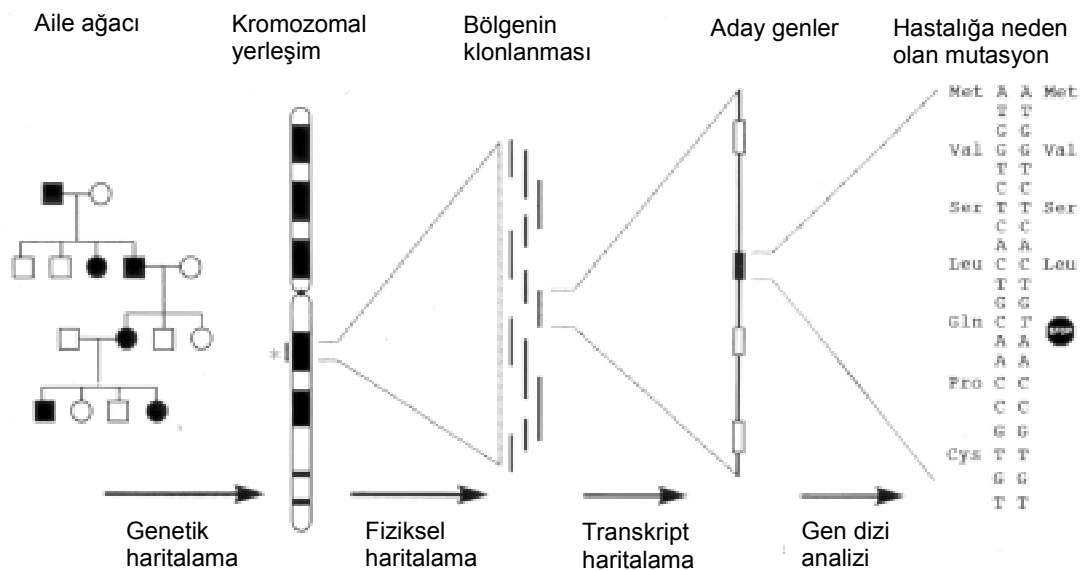
Resesif tek gen hastalığından etkilenen bireyin hastalığa neden olan gendeki mutasyon açısından homozigot olması gereklidir. Dolayısıyla hastalıktan etkilenen bireyin ebeveynlerinin hastalığa neden olan geni

heterozigot olarak taşınması beklenir. Aralarında akrabalık olan ebeveynlerin nadir bir hastalığa neden olan aynı heterozigot alele sahip olması durumunda, sözkonusu alelin çok büyük ihtimalle her iki ebeveynin ortak bir atasından kaynaklandığı düşünülür. Ebeveynlerin ortak atasının sahip olduğu alel nesilden nesile aktararak önce ebeveynlere sonra hasta bireye taşınmıştır. Dolayısıyla nadir bir resesif hastalığa sahip ve ebeveynleri arasında akrabalık olan bir birey çok büyük ihtimalle homozigot hastalık alellerini ortak atadan kalıtılarak alacaktır (*identical by descent*). Ayrıca mutasyona çok yakın yerleşimli kromozomal segment *cross-over* ile rekombinasyona uğramayacağı için bu bölgedeki SNP genetik belirleyiciler de ortak atadan kalıtılarak homozigot kalacaklardır. Şekil 2.2'de hastalığa neden olan geni çevreleyen kromozomal segmentler, genin her iki tarafında 3 SNP genetik belirleyici ile gösterilmiştir. Değişik SNP genetik belirleyiciler farklı renklerle temsil edilmektedir. Her ne kadar her ebeveyn-çocuk aktarımında, ebeveyn gametlerinde *cross over* ihtimali olsa da, mutasyonun yakınındaki genetik belirleyiciler birbirlerine olan yakın yerleşimleri nedeniyle rekombinasyona uğramayacak ve ortak atadan kalıtılarak eş kalacaklardır. Pozisyona bağlı klonlama, bu bölgenin polimorfik genetik belirleyicilerle yapılacak tüm genom taraması ile homozigot olarak tanımlanması prensibine dayanır (62). Bu homozigot genetik belirleyiciler çok nokta analizinde (*multipoint analysis*) LOD değer *peak*'i olarak tespit edilerek, hastalığa neden olan genin tespitine olanak sağlayacaktır (63) (Şekil 2.3). Pozisyona bağlı klonlama hastalığın ortak atadan kalıtıldığı ailelerin incelenmesiyle başlar. Homozigotluk haritalaması ile ortak kalıtılan genomik bölgeler tanımlanmaya çalışılır. Böylece aranan gen belli bir kromozom bölgesine indirgenir. Başka ailelerde de *cross-over*'ların gözlenmesi ile genin bulunduğu bölge daraltılmaya, aday gen sayısı azaltılmaya çalışılır. Son olarak hastalıktan etkilenen bireylerde fonksiyon kaybına neden olan mutasyonların gösterilmesi ile hastalığa neden olan mutasyonun bu genden kaynaklandığı ispatlanır. Bu teknik kullanılarak şimdiye dek birçok resesif hastalık geni ortaya çıkartılmıştır (8,16). Ebeveynler arasındaki akrabalık derecesinin uzak olması *cross-over* için daha fazla olasılık olmasına ve etkilenen bireyin

hastalığa neden olan geni daha az sayıda ve daha kısa homozigot segmentler içinde barındırmasına neden olurken, yakın akrabalık durumunda etkilenen bireyde daha fazla sayıda ve daha uzun homozigot segmentler görülmesi beklenir (11,64).



Şekil 2.2. Ortak atadan kalıtılarak homozigotluk.



Şekil 2.3. Pozisyona bağlı klonlama tekniği.

2.2.2. SDNS'e Neden Olan Yeni Genlerin Bulunmasında Homozigotluk Haritalaması Tekniğinin Uygunluğu

SDNS'e neden olan yeni genlerin bulunmasında homozigotluk haritalaması tekniğinin uygulanabilir olması için resesif kalıtılan SDNS genlerindeki mutasyonların birleşik heterozigottan ziyade homozigot mutasyon olması gerekmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada, SDNS'e sahip tüm dünya ölçekli bir hasta grubunda hastalığa neden olan ve resesif kalıtılan 2 gendeki (*NPHS1* ve *NPHS2*) mutasyonlar tespit edildiğinde, *NPHS1* bi-alelik mutasyonlarının %67'sinin (42,45) ve *NPHS2* bi-alelik mutasyonlarının %45'inin (10) homozigot olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle SDNS'e neden olan yeni bir genin tanımlanması için bu araştırmada homozigotluk haritalaması tekniğinin kullanılması planlanmıştır.

Ebeveynleri arasında akrabalık bulunan ya da etnik kökeni akraba evliliğinin sık görüldüğü bir bölge olan (*inbred*) bireylerde, resesif hastalık genlerindeki homozigot mutasyonların hemen hemen her zaman ortak bir atadan kalıtılan homozigot SNP genetik belirleyici segmentlerinde yerleştiği ve bu nedenle homozigotluk haritalaması tekniğiyle haplotip bloklarının yerinin tespitinin mümkün olduğu daha önceki bir çalışmayla gösterilmiştir (62). Bu çalışmada bağlantı analizi için parametrik LOD değeri hesaplaması kullanılmıştır. Başka bir araştırmada ise ebeveynleri arasında akrabalık bulunmayan ya da etnik kökeni akraba evliliğinin sık görülmediği bir bölge olan (*outbred*) bireylerde de resesif hastalık genlerindeki homozigot mutasyonların homozigotluk haritalaması tekniğiyle belirlenebileceği gösterilmiştir (11). Bu araştırmada bağlantı analizi için parametrik olmayan LOD değeri hesaplaması kullanılarak, parametrik LOD değeri hesaplaması için gerekli olan birkaç kuşaklı geniş ailelerin kullanılması kısıtlamasının üstesinden gelinmiştir (11). Bu araştırmada resesif böbrek hastalığına neden olan 13 farklı gende (Nephronophthisis (NPHP) genleri: *NPHP1-9*; NPHP benzeri fenotip genleri: *AHI1*, *MKS3* ve SDNS genleri: *NPHS1* ve *NPHS2*) homozigot mutasyona sahip olan ve ebeveynleri arasındaki akrabaçlık düzeyi birinci derece kuzen evliliğinden *outbred* bireylere kadar geniş bir dağılımda olan 72 bireyde, 250K SNP çip ile homozigotluk haritalaması

çalışması yapılmıştır. 72 bireyin 67'sinde (%93) hastalığa neden olan gendeki homozigot mutasyon, içinde bulunduğu homozigot haplotip tarafından oluşturulan parametrik olmayan LOD değer *peak*'i ile tespit edilebilmiştir. Hastalığa neden olan gendeki homozigot mutasyonun parametrik olmayan LOD değer *peak*'i ile tespit edilemediği 5 bireyde ise, genin bulunduğu homozigot haplotipin uzunluğunun mutasyon tespit sınırının altındaki bir kısalıkta (2.1 megabaz'dan daha kısa) olmasından dolayı homozigot haplotipin LOD değer *peak*'i oluşturmadığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada homozigotluk haritalamasının homozigot mutasyonları saptamadaki özgüllüğü yani LOD değer *peak*'lerinin homozigot olmayan bireylerde de sıklıkla görülüp görülmediği (yanlış pozitiflik), homozigot mutasyona sahip bireylerin ebeveynlerinden oluşan 20 kişilik bir gurubun homozigot haritalanması ile araştırılmıştır. Araştırmada ebeveynlerin %65'inin (13/20) LOD değer *peak*'ine sahip olmadığı bulunmuştur. Bu nedenle tekniğin %65 özgül olduğu düşünülmüştür. Özgüllüğünün %65 olması; yanlış pozitif bir LOD değer *peak*'inin şans eseri iki bireyde birden aynı bölgeye lokalize olup yanlış bir aday bölge işaret etme olasılığının yaklaşık 1:1000 ($0.35 \times 0.35 = 0.1225$) olması nedeniyle gen tanımlanması için bir risk teşkil etmediği düşünülmüştür (11).

2.2.3. Eksom Saptama ve Yüksek Ölçekli Dizileme

Çocukluk ve genç erişkinlik SDNS'ine sebep olan ancak henüz ortaya çıkartılmamış genlerin varlığı homozigotluk haritalaması tekniği ile gösterilmiştir (11). Ancak bu genlerin heterojenliği ve nadir gözlenmesi (<%1), yeni bir genin bulunmasına ciddi sınırlamalar getirmektedir. Yakın zamanda insan genomunun tüm kodlayan bölgelerinin dizilenebilmesi bu durumu dramatik bir şekilde değiştirmiştir (57-61). Modern teknolojik bir devrim olan eksom saptama ve yüksek ölçekli dizileme ile belirli bir genomik bölgedeki tüm DNA dizi değişiklikleri gözlenebilmektedir.

Bu çok avantajlı tekniğin zorluğu ise, normal genomik referans dizisine göre çok sayıda varyant tespit etmesi ve hastalığa neden olan mutasyonun tespitinin güçleşmesidir.

2.2.4. Homozigotluk Haritalaması ile Eksom Saptama ve Yüksek Ölçekli Dizileme Verilerinin Birleştirilmesi

Resesif hastalık genlerindeki homozigot mutasyonların hemen hemen her zaman ortak bir atadan kalıtılan homozigot SNP genetik belirleyici segmentlerinde yerleştiği ve bu nedenle homozigotluk haritalaması tekniğiyle haplotip bloklarının yerinin tespitiyle yeni genlerin bulunmasının mümkün olduğu daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak pozisyona bağlı klonlama tekniği ile belirlenen bölgedeki aday genlerin çokluğu ve bunların tek tek analiz edilmesinin oldukça masraflı olması ve pratik olmaması, yeni gen tanımlanmasında önemli bir hız kesici faktör olmuştur.

Eksom saptama ve yüksek ölçekli dizileme teknikleri ile belirli bir genomik bölgedeki tüm DNA dizi değişiklikleri gösterilebildiği için nadir genlerin tanımlanmasında teknolojik devrim niteliğindedir. Ancak bu tekniğin çok sayıda varyantı tespit etmesi nedeniyle hastalığa neden olan mutasyonun bu varyantlar arasından tespiti oldukça güçtür.

Bu nedenle araştırmada homozigotluk haritalaması tekniği ile eksom saptama ve yüksek ölçekli dizileme tekniklerinin birleştirildiği bir yaklaşımın kullanılması planlanmıştır (61). Bu sayede eksom saptama ve yüksek ölçekli dizileme ile ortaya çıkan çok sayıdaki varyasyonun yarattığı arka plan'ın (*background*), homozigotluk haritalaması tekniğiyle filtrelenerek aday bölge sayısının azaltılacağı ve filtrelenen varyantın mutasyon olma özgüllüğünün artacağı düşünülmüştür.

Aynı aile içinde aynı resesif hastalıktan etkilenen bireyler hastalığa sebep olan gendeki mutasyon için ortak atadan kalıtılarak eş olacak ve hastalığa sebep olan genin yakınındaki genomik bölgeler de hastalığa sebep olan genle birlikte değişmeden aktarılacaktır. Dolayısıyla hasta bireylerin tamamının homozigotluk haritalaması sonucu hastalığa sebep olan genin içinde bulunduğu haplotip bloğunun oluşturduğu LOD değer *peak*'ine sahip olması gerektiği düşünülmüştür. Bu durumda, hastalığa sebep olan genin, hasta bireylerin hepsinin ortak olarak sahip olduğu LOD değer *peak*'lerinde olması beklenir.

Bu sayede eksom saptama ve yüksek ölçekli dizileme ile ortaya çıkan çok sayıdaki varyasyonun, sadece hasta bireylerin hepsinin ortak olarak sahip olduğu LOD değeri *peak*'lerinde olması durumunda hastalığa sebep olan mutasyon olabileceği varsayımıyla filtrelenmesi planlanmıştır.

2.3. Amaç

Çocukluk ve genç erişkinlik SDNS'ine sebep olan ancak henüz ortaya çıkartılmamış genlerin bulunması doğrultusunda ilk basamak olarak, klinik incelemeler sonucunda çocukluk çağı SDNS fenotipine sahip olduğu belirlenen aileler, çocukluk çağı SNDS'ine yüksek oranda sebep olduğu bilinen genlerdeki (*NPHS1*, *NPHS2*, *LAMB2*, *PLCE1* ve *WT1*) mutasyonlar açısından direkt DNA dizi analizi ile taranmıştır. Bu 5 gen haricinde çocukluk çağı SDNS'ine sebep olan *SMARCAL1*, *COQ2*, *PDSS2*, *COQ6* ve *SCARB2* resesif mutasyonları çok nadir olarak görülmekte (<%1) ve oldukça ayırıcı fenotipik özellikler göstermektedir (*SMARCAL1*- Schimke Immüno-Osseöz Displazi; *COQ2*, *PDSS2*, *COQ6*- nörolojik bulgular ve duyma kaybı ile seyreden mitokondrial hastalık; *SCARB2*- myoklonik epilepsi). Araştırmaya grubunda bu özelliklere sahip bireyler bulunmaması nedeniyle, bu genlerin taranması yapılmamıştır. Araştırma grubundan, hastalıkları genetik olarak açıklanmış hastaların dışlanması, grubun geri kalan kısmından seçilecek ailelerde ileri inceleme yapılması ve hastalıktan sorumlu olabilecek olan yeni genlerin bulunmasını sağlayacak ilk basamağı oluşturmuştur.

Araştırmanın ikinci basamağında SDNS'e sebep olduğu bilinen genlerdeki mutasyonlara sahip olmadığı yönünde filtrelenmiş olan ve ebeveynleri arasında akrabalık olduğu bilinen 85 aile, homozigotluk haritalaması ile ileri analize gönderilmiştir.

Araştırmanın üçüncü basamağında ise, homozigotluk haritalaması ile analiz edilmiş 85 ailenin içinden seçilen bir aile eksom saptama ve yüksek ölçekli dizileme ile analiz edilerek SDNS'e neden olabilecek gen saptanmaya çalışılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Araştırma Grubu

Son 13 yılda Pediatrik Nefroloji Laboratuvarı, Michigan Üniversitesi, Ann Arbor, ABD'ye çocukluk çağı SDNS mutasyon analizi için tüm dünyadan gönderilen 2191 kişi (2056 farklı aileden gelen) araştırma grubunu oluşturmuştur. Hastaların çalışmaya katılımı *Institutional Reviews Board* Michigan Üniversitesi, ABD tarafından onaylanmıştır. SDNS tanısı pediatrik nefrologlar tarafından özelleşmiş merkezlerde kabul edilen kriterlere göre yapılmıştır (Arbeitsgemeinschaft für Padiatrische Nephrologie). Kan örnekleri, aile ağacı bilgileri ve klinik bilgiler www.renalgenes.org adresinden ulaşılabilecek olan standart bir anket formu ile toplanmıştır (Bkz. EK 1. Klinik Bilgi Formu). Aynı adreste aydınlatılmış onam formu da bulunmaktadır (Bkz. EK 2. Aydınlatılmış Onam İngilizce/Türkçe).

3.1.2. Mutasyon Analizi

Genomik DNA İzolasyonu

- *Puregene* DNA pürifikasyon kiti (Gentra)
- %100 isopropanol (Sigma Aldrich)
- %70 etanol (Sigma Aldrich)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

- 2X Taq PCR *Master Mix* Kit (Qiagen)
- **Primer_{Forward} (100 µM) (Integrated DNA Technologies)
- **Primer_{Reverse} (100 µM) (Integrated DNA Technologies)

NPHS1 geninin 1. eksomu yüksek GC nükleotit oranına sahip olması nedeniyle, amplifikasyonu için dH₂O yerine "Q solution" (Qiagen, Germany) kullanılmıştır.

**Çalışmada kullanılan tüm primerler *Primer3 Input (version 0.4.0)* programı ile tasarlanmıştır.

Agaroz Jel Elektroforezi

- 10X Tris Borat EDTA tampon pH 8.3 (Sigma Aldrich)
- Agaroz (Sigma Aldrich)

Yükleme Tamponu

- Gliserol (Merck)
- Distile su
- *Orange G* (Merck)
- Etidyum bromür (Sigma Aldrich)
- 50 bç DNA Moleküler ağırlık belirteci (Promega)

DNA Dizi Analizi

- *Big Dye Terminator v3.1* Tampon (5X) (Applied Biosystem)
- *Big Dye Terminator Mix v3.1* (Applied Biosystem)
- 5 M Sodyum Asetat (Sigma Aldrich)
- %99 Etanol (Sigma Aldrich)
- %70 Etanol (Sigma Aldrich)
- Hi-Di Formamid (Applied Biosystem)

3.1.3. Homozigotluk Haritalaması

GeneChip Human Mapping 250K (Styl) Array (Affymetrix) genotipleme için, örneklerin işlenmesi, hibridizasyonu ve taranması, üretici firmanın protokolu takip edilerek *University of Michigan Core Facility*'den hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir (www.michiganmicroarray.com).

Homozigotluk Haritalaması için Kullanılan Yazılımlar

- GENEHUNTER yazılımı: Non-parametric likelihood ratio z-scores” (ZLR scores) hesaplanması (alel paylaşımının hesaplanması).
- ALLEGRO yazılımı: homozigot segment tespiti.
- GNUPLOT yazılımı: ZLR değerleri genom boyunca genetik uzaklığa göre, kromozom pozisyonları p kolundan q koluna (soldan sağa) uzanacak şekilde işaretlenmesi (<http://www.gnuplot.info/>).
- ALOHOMORA yazılımı: ZLR değerleri insan genom dizilerinde her

100,000 nükleotide bir genetik belirleyici kullanılarak minor alel frekansları >0.2 , >0.3 ve >0.4 olan 3 farklı koşulda hesaplanması.

3.1.4. Eksom Saptama ve Yüksek Ölçekli Dizileme

Eksom Saptama

- NimbleGen 2.1M Human Exome Array (Roche/NimbleGen)

Saptanan DNA Parçacıklarının Yüksek Ölçekli Dizileme İçin Hazırlanması

- DNase-1 endonükleaz (Roche)
- Bal31 eksonükleaz (New England Biolabs)
- EGTA (Sigma Aldrich)
- PZR pürifikasyon kit (Qiagen)
- 20 mM Tris-HCL (pH 7.5) (Sigma Aldrich)
- 2 mM CaCl_2 (Sigma Aldrich)
- 20 mM MnCl_2 (Sigma Aldrich)
- EDTA (Sigma Aldrich)

Yüksek Ölçekli Dizileme

- DNA kütüphanesi oluşturulması: *Genomic DNA sample prep kit* (Illumina).
- *Illumina Genome Analyzer II: University of Michigan Core Facility*'den hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir (www.michiganmicroarray.com).
- *Genome Analyzer Pipeline 1.5*: Görüntü analizi ve bazların çağırılması (Illumina).
- FASTQ: Çağırılan her baz için DNA dizi bilgisinin ve kalite değerlerinin incelenmesi (Illumina).
- *CLC genomics workbench* (CLC-bio): Filtrelenmiş yüksek kalitedeki dizilerin insan referans genomuyla karşılaştırılması.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Ailelerde Mutasyon Analizi Yapılacak Genlerin Belirlenmesi

Araştırma grubunun klinik özellikleri doğrultusunda, hangi hastada hangi genin mutasyon analizi yapılacağına karar verilirken aşağıdaki strateji izlenmiştir.

1. Araştırma grubunun tümü çocukluk çağı SDNS'inden en yüksek oranda sorumlu olan *NPHS2/podocin* (%10-28) ve *WT1* (%5) mutasyonları açısından taranmıştır. *NPHS2*'nin tüm 8 eksonu ve *WT1*'in yalnızca 8 ve 9'uncu eksonları DNA dizi analizi ile mutasyon analizine tabi tutulmuştur (*WT1*'in sadece 8 ve 9'uncu eksonundaki mutasyonların SDNS'e sebep olduğu gösterilmiştir) (9). *NPHS2* DNA dizi analizinde kullanılan primerler Tablo 3.1'de verilmiştir. *WT1* dizi analizinde kullanılan primerler Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1. *NPHS2*'nin çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri.

| Ekson numarası | Primer | Ayrışma derecesi (T _m °C) | Ampilikon Uzunluğu (bp) |
|----------------|---------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Ekson 1 | 5'-AGTCCACAGCTCCACCAAGAC-3' | 60.41 | 408 |
| | 3'-AGGTTGCTGGGTTCCCTAATTAC-5' | 59.99 | |
| Ekson 2 | 5'-AATACCAAGAATTGGACCAACAG-3' | 57.48 | 244 |
| | 3'-CAGAAAACAGAAGTGAGAATGGG-5' | 60.2 | |
| Ekson 3 | 5'-CTTATGCCAAGGCCTTTTGAAG-3' | 60.20 | 205 |
| | 3'-ATCTGCATGGGTTGAAGAAATTG-5' | 60.31 | |
| Ekson 4 | 5'-AGAAAGGTGAAACCCAAACAGC-3' | 59.08 | 218 |
| | 3'-ATCATTTTGTCCACGGTAGGTAG-5' | 57.39 | |
| Ekson 5 | 5'-TCTAACCCACATAGGAAAGGAG-3' | 60.33 | 364 |
| | 3'-GGATGGAACTGGCCATAGAAG-5' | 61.23 | |
| Ekson 6 | 5'-CTTAGTACAGAACAATGGCCACC-3' | 59.57 | 299 |
| | 3'-TGGCTGTAAGATATTAGGTGATTTG-5' | 58.71 | |
| Ekson 7 | 5'-GACAGCAGTAGAGAGGCTTGC-3' | 59.40 | 255 |
| | 3'-AATGGACAGTAAGGAAGCAAAGG-5' | 60.12 | |
| Ekson 8 | 5'-AGTAGATGCTCAGTGCTTGTCTG-3' | 59.74 | 463 |
| | 3'-GAATGAGGACAGAGTGTCTCCC-5' | 60.01 | |

Tablo 3.2. *WT1*'in çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri.

| Ekson numarası | Primer | Ayrışma derecesi (T _m °C) | Amplikon Uzunluğu (bp) |
|----------------|-------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Ekson 1-1 | 5'-ATTCACCCACCCACCCAC-3' | 61.52 | 507 |
| | 3'-TGAAGGAGTGAGGCGGC-5' | 61.11 | |
| Ekson 1-2 | 5'-TGTGCCCTGCCTGTGAG-3' | 60.59 | 475 |
| | 3'-TAAGAGCTGCGGTCAAAGG-5' | 60.51 | |
| Ekson 2 | 5'-TGGTTCAGACCCACTGCC-3' | 60.69 | 252 |
| | 3'-GGAGAGGAGGATAGCACGG-5' | 59.77 | |
| Ekson 3 | 5'-GGCTCAGGATCTCGTGTCTC-3' | 59.95 | 324 |
| | 3'-GTGCCTCCAAGACCCTGC-5' | 61.83 | |
| Ekson 4 | 5'-TCCATTGCTTTTGAAGAAACAG-3' | 59.38 | 217 |
| | 3'-CTTTGAAATGGTTCAAACAGG-5' | 57.27 | |
| Ekson 5 | 5'-CACTGGATTCTGGGATCTGG-3' | 60.47 | 186 |
| | 3'-GCCAGTCAGCAAGGCCTAC-5' | 60.96 | |
| Ekson 6 | 5'-ATTTCCAAATGGCGACTGTG-3' | 60.89 | 217 |
| | 3'-GGCCGGTAAGTAGGAAGAGG-5' | 60.09 | |
| Ekson 7 | 5'-CAGTGCTCACTCTCCCTCAAG-3' | 60.18 | 289 |
| | 3'-CTGGAAAAGGAGCTCTTGAAC-5' | 58.19 | |
| Ekson 8 | 5'-GTTGCCTTTAATGAGATCCCC-3' | 58.97 | 215 |
| | 3'-GAATCATGAAATCAACCCTAGCC-5' | 59.39 | |
| Ekson 9 | 5'-GGAAATCTAAGGGTGAGGCAG-3' | 60.43 | 226 |
| | 3'-AGTCTTTTCCAATCCCTCTCATC-5' | 58.57 | |
| Ekson 10 | 5'-AATTCAGAGTGGGTGCCTTG-3' | 60.11 | 305 |
| | 3'-GAGGAGTGGAGAGTCAGACTTG-5' | 58.12 | |

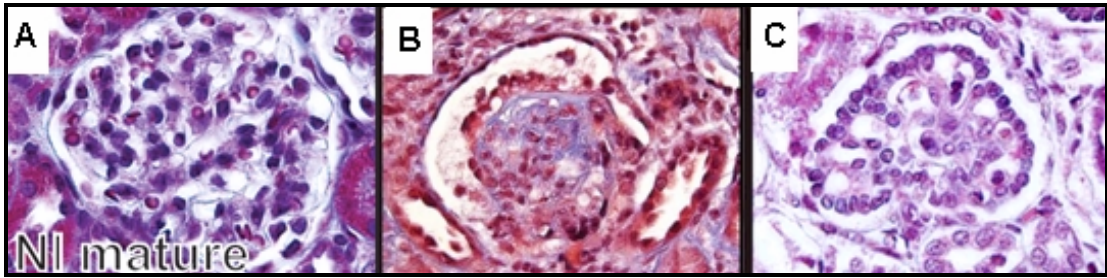
2. Araştırma grubu içinden SDNS ortaya çıkış yaşı hayatın ilk 3 ayında gerçekleşen hastalarda *NPHS2/podocin* ve *WT1*'e ek olarak *NPHS*'in tüm 29 eksonu DNA dizi analizi ile mutasyon analizine tabi tutulmuştur (SDNS ortaya çıkışı hayatın ilk 3 ayında gerçekleşen hastalarda *NPHS1* mutasyonları %88 oranında görülmektedir) (10). *NPHS1* dizi analizinde kullanılan primerler Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3. *NPHS1*'in çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri.

| Ekson numarası | Primer | Ayrışma derecesi (T _m °C) | Ampilikon Uzunluğu (bp) |
|----------------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Ekson 1-2 | 5'-AAGGGAGGAGAGTAACGGAAAG-3' | 61.17 | 521 |
| | 3'-GATCACTCTGGGAGACACGAG-5' | 61.78 | |
| Ekson 3-4 | 5'-GGATCAGAGCCTGAGACCCTC-3' | 58.93 | 556 |
| | 3'-GAACACACACCCTTCCCACTC-5' | 59.86 | |
| Ekson 5 | 5'-CCATGCTCCCCAGAATCTATC-3' | 60.17 | 196 |
| | 3'-GGTTCCCATGGGGAAAATTAG-5' | 58.23 | |
| Ekson 6-7 | 5'-TCTCTAGGCTCCAATTCTCACTG-3' | 57.02 | 539 |
| | 3'-ACACACAGATGGTTCTCTGAGG-5' | 59.64 | |
| Ekson 8 | 5'-ACTGCAGTGGCTGAAGGTGAG-3' | 58.97 | 310 |
| | 3'-CTGAGATCTTTGGCATCCAGTAG-5' | 59.29 | |
| Ekson 9 | 5'-TGGGCTGGTCTGTGAGAAATC-3' | 59.66 | 286 |
| | 3'-TTCCCTATCCACGAGTCATGC-5' | 60.84 | |
| Ekson 10-11 | 5'-CTCTAGCACGATGGATAGGGG-3' | 60.05 | 489 |
| | 3'-CAAGATTCTGAAGGAGAGAAGGG-5' | 60.84 | |
| Ekson 12 | 5'-TCACTCAGTTCCACTCCCAC-3' | 60.94 | 324 |
| | 3'-GAGGAGCGAGACTCAGAGGTTAG-5' | 60.20 | |
| Ekson 13-14 | 5'-GAGAAATCTGGGAGCACCTTC-3' | 61.33 | 558 |
| | 3'-AAGACCCAAGGAGTAGTTTAGGG-5' | 59.12 | |
| Ekson 15-16 | 5'-CAACTTTAACCCTTGAACCTGTG-3' | 59.79 | 494 |
| | 3'-GAGCTCCCACAATGAGGAGAC-5' | 60.66 | |
| Ekson 17 | 5'-CTAAGACATCCCTCCCACCTG-3' | 59.92 | 262 |
| | 3'-GGAACCTCACAGTCAAGAAACCAC-5' | 60.38 | |
| Ekson 18-19 | 5'-GGCTAGGAGAATGAGGCTACAG-3' | 60.00 | 558 |
| | 3'-CTTCCTTCTCTGCAGGGACTC-5' | 59.62 | |
| Ekson 20 | 5'-TGGATAGATAGGCAGACGGTTAC-3' | 59.05 | 275 |
| | 3'-CCTCACACATACACAGAACTTCC-5' | 61.13 | |
| Ekson 21-22 | 5'-CTAGGGAAAACCTGGACAGAATC-3' | 59.43 | 508 |
| | 3'-TTCACCATACTACCCTACACATCC-5' | 59.20 | |
| Ekson 23 | 5'-ATGAATCTAATAGGCTTAAGAAGAGG-3' | 59.35 | 207 |
| | 3'-TAAGCAGCTGTGACTACAAGCAG-5' | 59.65 | |
| Ekson 24-25-26 | 5'-ACTTGGTCAGGGCTACACTTTC-3' | 61.02 | 607 |
| | 3'-ACAAACAAAGCCCTTTCCATC-5' | 59.54 | |
| Ekson 27-28 | 5'-ATCAGGTTGATCATTGCCCTTC-3' | 60.46 | 442 |
| | 3'-TAGGAGGTAGGCTCCAGCAC-5' | 59.7 | |
| Ekson 29 | 5'-GAAGTTAAGCAGGGGCATGTATC-3' | 59.92 | 324 |
| | 3'-TTGGGTTTTATGGAGCTCACC-5' | 59.93 | |

3. Araştırma grubu içinden SDNS fenotipi ve böbrek biyopsisi difüz mezanjiyal skleroz histolojisi gösteren hastalarda *NPHS2/podocin* ve *WT1*'e ek olarak *PLCE1*'in tüm 31 eksonu DNA dizi analizi ile mutasyon analizine tabi tutulmuştur. *PLCE1* mutasyonu, SDNS ve böbrek biyopsisi difüz mezanjiyal skleroz histolojisi gösteren hastalarda gösterilmiştir (8). Şekil 3.1'in 'A' penceresinde normal olgun glomerül histolojisi gösterilmektedir. 'B' penceresinde *LAMB2* veya *PLCE1* gen mutasyonunda görülen difüz mezanjiyal glomerüloskleroz histopatolojisi, küçük, tam gelişmemiş glomerül ve boşluklu podositlerin sklerotik glomerüler ağı taç şeklinde sardığı gösterilmektedir. 'C' penceresinde gestasyonel gelişimi 28 hafta seviyesinde olan podositler'in DMS benzeri histoloji gösterdiği izlenmektedir.

PLCE1 dizi analizinde kullanılan primerler Tablo 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.1. Normal glomerül, difüz mezanjiyal glomerüloskleroz ve gestasyonel gelişimi 28 hafta seviyesinde olan glomerüllerin histolojik karşılaştırılması. A. Normal olgun glomerül; B. *LAMB2* veya *PLCE1* gen mutasyonunda görülen difüz mezanjiyal glomerüloskleroz histopatolojisi; C. Gestasyonel gelişimi 28 hafta seviyesinde olan podositler'in DMS benzeri histoloji gösterdiği izlenmektedir.

Tablo 3.4. *PLCE1*'in çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri.

| Ekson numarası | Primer | Ayrışma derecesi (T _m °C) | Ampilikon Uzunluğu (bp) |
|----------------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Ekson 1_1 | 5'-CTTTGGGAGGACTTGTGTATCTG- | 59.20 | 585 |
| | 3'-ATGGAAGGTCTGTCTAGTTCCAG-5' | 59.24 | |
| Ekson 1_2 | 5'-CTGCAACAACATATTGAGAAACC-3' | 61.03 | 555 |
| | 3'-AAAAGGTCTTGGCAGCTTGAC-5' | 59.48 | |
| Ekson 2 | 5'-ACCTGTAAACTGATGGAATTGGC-3' | 60.72 | 590 |
| | 3'-CAATTATGACAATGGAAATTTGG-5' | 58.30 | |
| Ekson 3 | 5'-AGTGTTCACACTTGGAGCATC-3' | 60.14 | 501 |
| | 3'-TGAACCTTAATTTCCATCAGGAG-5' | 57.45 | |
| Ekson 4 | 5'-CAAGTAAATATCTGTTGCAGGGG-3' | 60.92 | 435 |
| | 3'-TATGCTTGAAAATCACTTACGGG-5' | 60.12 | |
| Ekson 5 | 5'-CAGGACCTACAGGTCTTTCATTTTC-3' | 59.20 | 376 |
| | 3'-GGACAATTAATTCAGTGCCATTC-5' | 59.96 | |
| Ekson 6 | 5'-GAATTTAGGCTCCTTGCTGTAAAC-3' | 59.72 | 397 |
| | 3'-AGACAGGGCCTGATGAGACAG-5' | 60.83 | |
| Ekson 7 | 5'-CTAGCCAAGTATGTTATCCAGGC-3' | 58.23 | 340 |
| | 3'-AAGTAGGAAACAACATCAACAGG-5' | 59.98 | |
| Ekson 8_1 | 5'-GTGAAAATGTCTTTGGGTTGTTC-3' | 59.51 | 461 |
| | 3'-CCATGTATACAGCCTTCACTGC-5' | 61.25 | |
| Ekson 8-2 | 5'-GACAATAGCACCTTGACCTGG-3' | 60.07 | 458 |
| | 3'-AGTAACTGTCAGAGCTGGGAGC-5' | 60.94 | |
| Ekson 9 | 5'-CATTAATATATTTACTTCCCCATTGC-3' | 58.38 | 313 |
| | 3'-ATGTTCCACCATACAGCGGTCC-5' | 58.44 | |
| Ekson 10 | 5'-GAACTAAAGCAGTGATGGGAGAG-3' | 58.59 | 325 |
| | 3'-AAATGTTTGCAATGCTTAAATCAC-5' | 59.48 | |
| Ekson 11 | 5'-TTGTATTTGGTTCTGAGGGAAAG-3' | 59.53 | 297 |
| | 3'-TGTAAGATATGCCCTTCCACAC-5' | 60.25 | |
| Ekson 12-13 | 5'-AAGTCTGGTGGGACAGAATCAC-3' | 57.89 | 491 |
| | 3'-GAGTTTGTGTGACTGGACCTCTG-5' | 58.03 | |
| Ekson 14 | 5'-GAACTTTGCAAAGATGCTGG-3' | 60.39 | 406 |
| | 3'-GTCCCAGATTTAAAGGCTTTGG-5' | 58.6 | |
| Ekson 15-16 | 5'-AAAATGATGTGGTGGTTTCTTTC-3' | 59.24 | 477 |
| | 3'-TAAGCTCTTCAAAGGAGTCTGGG-5' | 60.23 | |
| Ekson 17 | 5'-CTACATGCTGGGTTTAGTTTCGAG-3' | 59.83 | 267 |
| | 3'-GATGGTACCACTCTACTCCAGC-5' | 57.35 | |
| Ekson 18 | 5'-TTCTGTGGCTATAACTACCCTGC-3' | 59.72 | 238 |
| | 3'-CCAATGACAATTGCAAAACAAG-5' | 59.56 | |
| Ekson 19 | 5'-CAGCTTCTTTCCTAGTTCCTCTTC-3' | 60.90 | 472 |
| | 3'-ATTGGTCTATGGAATGAAAAGCC-5' | 59.79 | |
| Ekson 20 | 5'-AACGATTGTGTTAACATCAGGG-3' | 58.01 | 321 |
| | 3'-GTATTACTGGTCTTTGGCGCTC-5' | 59.34 | |
| Ekson 21 | 5'-TAGCTCTTAAGTGAAGCATTGGG-3' | 58.99 | 262 |
| | 3'-TATCACCAAGTGAACCTTTGGCAG-5' | 59.66 | |
| Ekson 22 | 5'-ATAAAAGAGCTTTGGGAATCCAG-3' | 61.10 | 278 |
| | 3'-TTTTGAGAGTGTTCACAATGCC-5' | 59.68 | |
| Ekson 23 | 5'-AATGTTGAGTTGCCTTGCTTG-3' | 58.93 | 270 |
| | 3'-GGGAAGTGCTTAGACAGTAAAATATC-5' | 58.06 | |
| Ekson 24 | 5'-TGCTATGACTGTTTACTGGGATG-3' | 59.17 | 480 |
| | 3'-TACTCTCACATATGGTGTGCC-5' | 60.58 | |
| Ekson 25 | 5'-TAAGGTGATACTTAAGCGACAAAG-3' | 57.02 | 290 |
| | 3'-CAAAACCAGTTCGTTTTCCAGG-5' | 59.85 | |

Tablo 3.4. (devam) *PLCE1*'in çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri.

| Ekson numarası | Primer | Ayrışma derecesi (T _m °C) | Ampilikon Uzunluğu (bp) |
|----------------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Ekson 26 | 5'-AGCAGTGAGGTGCAGAGGTTG-3' | 61.15 | 39 |
| | 3'-TAAGGAAATTCTGGCATCCATC-5' | 59.76 | |
| Ekson 27 | 5'-ACTTCCAGGAGCATCTTCTTTTC-3' | 59.06 | 243 |
| | 3'-CCCACCTTCAGTGTAGCAATC-5' | 59.36 | |
| Ekson 28 | 5'-GCACCTCTGTATCAAATAGAGCTTAG-3' | 59.13 | 282 |
| | 3'-CACACAGGCATTTATACACACAC-5' | 58.03 | |
| Ekson 29 | 5'-TGAACACCATGAAAGTTGATTTG-3' | 57.13 | 350 |
| | 3'-AATTTTCAGGGAGGTTGTGAGTG-5' | 57.92 | |
| Ekson 30 | 5'-TCTACATCACCAAGATAACAAGCTC-3' | 57.51 | 353 |
| | 3'-GGAACCTTCACTCATAAAATGAGCC-5' | 60.36 | |
| Ekson 31 | 5'-TATAGAATGAATGCAAATGTTGGAG-3' | 59.09 | 373 |
| | 3'-TCTCCTAAATTTACCAGCTTCC-5' | 58.32 | |
| Ekson 32 | 5'-GTGTCATGTGACAGAGGAACCTG-3' | 58.29 | 312 |
| | 3'-GTTTAAGTTAAGCCCTGTTCCAG-5' | 60.07 | |

4. Araştırma grubu içinden SDNS fenotipi ve böbrek biyopsisi difüz mezanjiyal skleroz histolojisi göstermesine ek olarak Pierson sendromu benzeri göz anomalileri olan hastalarda, *NPHS2/podocin* ve *WT1*'e ek olarak *LAMB2*'nin tüm 32 eksonu DNA dizi analizi ile mutasyon analizine tabi tutulmuştur (*LAMB2* mutasyonu, SDNS ve böbrek biyopsisi difüz mezanjiyal skleroz histolojisi gösteren ve göz anomalileri olan hastalarda gösterilmiştir) (Şekil 3.1) (6,7). *LAMB2* dizi analizinde kullanılan primerler Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.5. *LAMB2*'nin çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri.

| Ekson numarası | Primer | Ayrışma derecesi (Tm °C) | Ampilikon Uzunluğu (bp) |
|----------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Ekson 1-2 | 5'-AAAGACCCACAGGCAGAGTTG-3' | 60.88 | 517 |
| | 3'-GGGATTAGAATCAGTGCCTCAG-5' | 60.10 | |
| Ekson 3-4 | 5'-CTACTGCATCGTCAGTCACCTG-3' | 59.92 | 430 |
| | 3'-CTCAAGGAGGCTGTGTTAAGGAG-5' | 59.99 | |
| Ekson 5-6 | 5'-GAGCTATTTGAGGGCAGTCTTG-3' | 60.79 | 477 |
| | 3'-GGAAGCACCCAAAATAGTTACTG-5' | 60.33 | |
| Ekson 7-8 | 5'-TGTATAGGAGGTCTTTCAAGGTG-3' | 61.25 | 534 |
| | 3'-GATACAGCCTGGGTTTTAGGG-5' | 61.46 | |
| Ekson 9 | 5'-TCTTACCCTTGACCTGGTTC-3' | 59.82 | 304 |
| | 3'-CAATTTAGACAGCAGTCCAGCTC-5' | 59.04 | |
| Ekson 10-11 | 5'-GACTGGCAGTGAGCTAGTTGAG-3' | 59.58 | 555 |
| | 3'-ACTGGCATAGATGTGACACCC-5' | 59.81 | |
| Ekson 12-13 | 5'-TAAGACGTGTGGTTGGGATTTTC-3' | 59.83 | 443 |
| | 3'-CAGTCATAGACGTGTCCACCC-5' | 60.44 | |
| Ekson 14-15 | 5'-GTGATATCTAGCTTTGGCAGGAG-3' | 61.10 | 486 |
| | 3'-AACAGATGAATGAGCTGTGGG-5' | 60.89 | |
| Ekson 16 | 5'-CCCAGATGATTTGTACAGGGC-3' | 58.02 | 263 |
| | 3'-CTATCCCTCAAGTCCCACACC-5' | 60.07 | |
| Ekson 17-18 | 5'-AGTGCTAAGGCAAGTGCTCTG-3' | 60.43 | 553 |
| | 3'-GAGAGAACAGTAATGGGAAGGAG-5' | 57.97 | |
| Ekson 19-20 | 5'-CCACCTAGACTCCCCTACTCAC-3' | 59.86 | 618 |
| | 3'-CACGGTTAAGAGGAAGCTGTG-5' | 59.68 | |
| Ekson 21 | 5'-AGGCTATACGGGTGAGTGGATG-3' | 61.09 | 350 |
| | 3'-CCAAGATGAGCACAGTAGTCAAG-5' | 59.10 | |
| Ekson 22-23 | 5'-AGAGCTGTCACCGTGAGTATGAG-3' | 60.50 | 561 |
| | 3'-AAAGAGCAGAGCACAGAGTTAGG-5' | 60.10 | |
| Ekson 24 | 5'-CCAGGGTAGATGGAGGACTTC-3' | 59.75 | 512 |
| | 3'-ACATCTGTCAGGTCTGCCTCG-5' | 61.94 | |
| Ekson 25 | 5'-GAAGGGCCTAAGAATACATGGTG-3' | 60.19 | 318 |
| | 3'-ATAGGCACCTAAATTGGGCAGAG-5' | 59.14 | |
| Ekson 26 | 5'-AACTTCCTGGGTGAGTTGTTAGC-3' | 60.12 | 374 |
| | 3'-CCCAGTGCTAGGTCTGCTGTAG-5' | 60.30 | |
| Ekson 27 | 5'-GCAGGTGGGTGTAGATGTTCC-3' | 58.00 | 472 |
| | 3'-TGAACCAAGGGAGATACAGACAC-5' | 59.5 | |
| Ekson 28-29 | 5'-GTACATGTCCTGAGTCCATACCC-3' | 59.84 | 604 |
| | 3'-GGTGAGCCAAAGGTTACACAG-5' | 59.68 | |
| Ekson 30-31 | 5'-GACATCAGTGGGACAAGGTTATG-3' | 59.96 | 568 |
| | 3'-AAGGGCAGGTGTCAGTTTAGG-5' | 59.86 | |
| Ekson 32 | 5'-GCTACAGGGTAAGAAATGGGG-3' | 60.72 | 303 |
| | 3'-GTTCACTGTTTATTGGGG-5' | 58.32 | |

3.2.2. Mutasyon Analizi

Genomik DNA İzolasyonu

Periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu, Puregene DNA pürifikasyon kiti (Gentra, Minneapolis, MN) aracılığıyla firmanın sağladığı protokol takip edilerek yapılmıştır.

1. 3 ml tam kan örneği 9 ml RBC liziz solusyonu ile 15 ml'lik santrifüj tübünde karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
2. Beyaz kan hücrelerini çöktürmek için örnekler 2000g'de 2 dk santrifüj edildi.
3. Supernatan dökülüp, pellet vortekslenerek çözüldükten sonra üzerine 3 ml hücre liziz solusyonu eklendi.
4. Karışım 2000 g'de 10 saniye vorteks ile karıştırılıp 37°C'de 48 saat inkübe edildi.
5. Örnek buz üzerine 3 dk süreyle konularak oda sıcaklığına getirildi.
6. Hücre çözeltilisine 1 ml protein çökeltme solusyonu eklendi.
7. Karışım 20 sn vorteks ile karıştırıldı.
8. Karışım 2000 g'de 5 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant 15ml'lik santrifüj tüpüne transfer edildi ve üzerine 3 ml %100 isopropanol eklendi.
10. Karışım 50 defa alt-üst edilerek DNA'nın beyaz çökeltiiler şeklinde görülmesi sağlandı.
11. 2000 g'de 3 dk santrifüj edilerek DNA çöktürüldü ve %70 etanol ile yıkandıktan sonra kurutuldu.
12. DNA pellet'i üstüne 250 µl distile su eklenerek çözülmesi sağlandı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Mutasyon Analizi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) "exon-flanking" primerler aracılığıyla saflaştırma basamağı gerektirmeyen bir protokol aracılığıyla yapılmıştır. Saflaştırma basamağı, hibridizasyon sırasında reaksiyonda kullanılmamış olarak kalan primerlerin veya primer-dimer'lerin reaksiyondan uzaklaştırılmasını amaçlamakta ve dizi analizi okunmasını güçleştiren arka plan'ın (*background*) önlenmesini sağlamaktadır. Bu protokolda daha az primer, daha fazla DNA örneği ve daha fazla sayıda PZR döngüsü kullanılarak primer'lerin tamamen tüketilmesi ve dizileme sonucu oluşan *background*'un önlenmesi başarılmıştır. Bu hem araştırma basamaklarından birini eksilterek çalışmanın daha seri yapılabilmesine imkan sağlamış, hem

de çalışmanın maliyetini düşürmüştür.

Safılaştırma Gerektirmeyen PZR Reaksiyon Ana Karışımı

| | |
|------------------------------------|-----------------|
| H ₂ O* | 4 µl |
| 2xQiagen Mastermiks | 6 µl |
| Genomik DNA (20-50 ng/µl) | 2 µl |
| Primer _{Forward} (100 µM) | 0.015 µl |
| Primer _{Reverse} (100 µM) | <u>0.015 µl</u> |
| PZR Ana Karışım Toplam | 12 µl |

**NPHS1* ekson 1'in yüksek GC nükleotit oranına sahip olması nedeniyle çoğaltılmasını kolaylaştırmak için H₂O yerine *Q solution* (Qiagen, Germany) kullanılmıştır.

PZR Reaksiyon Koşulları

PZR reaksiyonu için Applied Biosystem 9700 cihazı kullanılmıştır.

| Sıcaklık | Zaman | Döngü |
|----------|--------|-------|
| 94 °C | 3 dak. | 1X |
| 94 °C | 30 sn. | } 32X |
| 60 °C | 45 sn. | |
| 68 °C | 60 sn. | |
| 68 °C | 7 dak. | 1X |
| 4 °C | Bekle | |

PZR örnekleri TBE tampon ile hazırlanmış %2'lik agaroz jelde 5 µl örnek yüklenerek analiz edilmiştir

Geriye kalan 7µl PZR ürününe 133 µl H₂O eklenerek ürün 20 kat sulandırılmıştır (1 pmol/µl). Bu çözelti ileri safılaştırma basamaklarına ihtiyaç duymadan DNA dizi analizine gönderilmiştir.

DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi için SEQUENCHER 3.8™ (Gene Codes, Ann Arbor, MI) yazılımı kullanılmıştır. *NPHS2* dizi analizinde ekson 1 ve 6 için *reverse* primerler, ekson 2, 3, 4, 5, 7, 8 için *forward* primerler kullanılmıştır. *NPHS1*,

LAMB2, *PLCE1*'in tüm eksonlarının ve *WT1*'in 8. ve 9. eksonlarının dizilenmesi için *forward* primerler kullanılmıştır. DNA dizi analizi sonuçları gen bankasındaki kontrol diziler ile karşılaştırılmıştır (*NPHS1*: NM_004646, *NPHS2*: NM_014625, *WT1*: NM_024426, *PLCE1*: NM_016341, *LAMB2*: NM_002292).

- i) Bulunan varyantlar, öncelikle "Genome Reference Consortium h36/hg18" veri bankasıyla (<http://genome.ucsc.edu>) karşılaştırıldı ve bilinen SNP'ler olup olmadıkları teyit edildi.
- ii) Bulunan varyantların yanlış anlamlı (*missense*) veya delesyon/insersiyon tipinde olması durumunda, bu varyantların daha yüksek olasılıkla mutasyon olabileceği düşünüldü ve evrimsel korunum ve kontrol populasyon taramasında bu varyantlara öncelik verildi.
- iii) Varyantların evrimsel korunumu *UCSC genome browser* (<http://genome.ucsc.edu>) ile kontrol edildi ve evrimsel olarak sıkı korunmuş bölgelerdeki nükleotit değişikliklerinin daha yüksek olasılıkla mutasyon olabileceği düşünüldü. Varyantların mutasyon olarak sınıflandırılabilmesi için, bölgenin nükleotit diziliminin en az *Danio rerio*'ya kadar korunmuş olması gerekliliği düşünüldü.
- iv) Varyantların sebep olacağı aminoasit değişiminin proteinin yapısı ve fonksiyonu üzerine etkisi olup olmadığı "PolyPhen" (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) ve "PolyPhen2" (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) değerleriyle tespit edildi.
- v) Varyantların polimorfizm olma olasılıkları, araştırma grubunun yaş ve etnik özelliklerini temsil edecek şekilde seçilmiş 80 sağlıklı kontrol bireyinin *NPHS1*, *NPHS2*, *LAMB2*, *PLCE1* ve *WT1* için dizilenmesi ile oluşturulan polimorfizm veri bankasıyla ve 1000 genom projesi verisiyle (www.1000genomes.org) karşılaştırılması ile dışlandı.

- vi) Tüm mutasyonlar tamamlayıcı DNA ipliğinin dizilenmesiyle doğrulandı.
- vii) Ebeveynlerin kan örneklerinin temin edilebildiği hallerde, ebeveyn örneklerinde DNA dizi analiziyle mutasyonların segregasyonu teyit edildi.

3.2.3. Homozigotluk Haritalaması ile İncelenecek Ailelerin Belirlenmesi

Homozigotluk haritalaması tekniğiyle yapılan yeni gen tanımlamaları şimdiye kadar daha çok ebeveynler arasında yakın akrabalık olan ailelerde başarılmıştır. Ebeveynler arasında yakın akrabalık olması durumunda çocuklarda gözlenen homozigot segmentlerin uzun olması, bölgenin SNP genetik belirleyici setleriyle belirlenmesini kolaylaştırır. Bu nedenle, çocukluk çağı SDNS'ine neden olduğu bilinen genlerdeki mutasyonlar açısından DNA dizi analizi ile taranmış ve mutasyona rastlanmamış olan 1746 aile arasından, ebeveynler arasında akrabalık olduğu bilinen 85 aile homozigotluk haritalaması ile ileri analize gönderilmiştir.

3.2.4. Homozigotluk Haritalaması

Ebeveynler arasında akrabalık olduğu bilinen 85 aile homozigotluk haritalaması tekniğiyle, *Affymetrix GeneChip Human Mapping 250K (Styl) Array* kullanılarak incelendi. Örnekler *University of Michigan Core Facility*'de üreticinin standart protokolü izlenerek işlendi, hibridize edildi ve tarandı (www.michiganmicroarray.com). Alel paylaşımı analizi için, yüksek orandaki alel paylaşımını iyi bir şekilde tahmin edebildiği gösterilmiş olan parametrik olmayan Z-değeri (*Non-parametric likelihood ratio z-scores*) (*ZLR scores*) (63) GENEHUNTER (65) programının modifiye bir versiyonu kullanılarak hesaplandı. Homozigot segmentler ALLEGRO (66) programında ZLR değerleri kullanılarak tespit edildi. Parametreler, hastalık alel frekansı olarak 0.001 ve genetik belirleyici alel frekansı *Affymetrix* tarafından belirlenen şekilde kullanıldı. ZLR değerleri hesaplanırken ebeveynlerin asıl akrabalık dereceleri ne olursa olsun, birinci dereceden kuzen olduğu varsayımı kullanıldı. Hastalıktan etkilenen tek hasta birey olması durumunda,

parametrik olmayan ALLEGRO hesaplamalarının yapılabilmesi için gerçekte varolmayan bir kardeş hesaplamaya katıldı. ZLR değerleri genom boyunca genetik uzaklığa göre, kromozom pozisyonları p kolundan q koluna (soldan sağa) uzanacak şekilde GNUPLOT yazılımı kullanılarak işaretlendi (<http://www.gnuplot.info/>).

ALOHOMORA (67) programı aracılığıyla, ZLR değerleri insan genomik DNA dizisinde her 100,000 nükleotitte bir genetik belirleyici kullanılarak minor alel frekansları >0.2 , >0.3 ve >0.4 olan 3 farklı koşulda hesaplandı. Minor alel frekanslarının >0.2 , >0.3 veya >0.4 olduğu 3 koşuldaki ikisinde ZLR peak'inin 2.0 değerini geçmesi durumunda sabit ZLR *peak*'i (*consistent ZLR peak*) (*cZLR*) olarak isimlendirildi ve hastalığa neden olduğu bilinen homozigot mutasyonun yerinin bu *cZLR peak*'i ile gösterildiği düşünüldü. Aynı strateji, resesif böbrek hastalığı yapan 13 farklı gende (Nefronofitizis (NPHP) genleri: *NPHP1-9*; NPHP benzeri fenotip genleri: *AHI1*, *MKS3* ve *SDNS* genleri: *NPHS1* ve *NPHS2*) homozigot mutasyonuna sahip olduğu bilinen 72 birey'in 250K SNP çip ile homozigot haritalandığı bir çalışmada kullanılmış ve *cZLR peak*'lerinin 72 bireyin 67'sinde (%93) hastalığa neden olan gendeki homozigot mutasyonu tespit edilebildiği ve haplotip inspeksiyonu sırasında da ilgili bölgede devamlılık gösteren homozigot segmentlerin bulunduğu gösterilmiştir (11). Hastalığa neden olan gendeki homozigot mutasyonun *cZLR peak*'i ile tespit edilemediği 5 bireyde ise genin bulunduğu homozigot haplotipin uzunluğunun mutasyon tespit sınırının altındaki bir kısalıkta olduğu gözlenmiştir. Ancak bu çalışmada homozigotluk haritalaması ile incelenmek üzere seçilen bireylerin ebeveynleri arasında akrabalık olması nedeniyle, bireylerdeki homozigot haplotipin 250K SNP çip'in tespit alt limiti olan 2.1 magabazdan çok daha uzun olacağı, bu nedenle tekniğin yüksek bir duyarlılıkla homozigot bölgeleri göstereceği düşünülmüştür. Aynı çalışmada homozigotluk haritalamasının homozigot mutasyonları saptamadaki özgüllüğü (*cZLR peak*'lerinin homozigot olmayan bireylerde de sıklıkla görülüp görülmediği) %65 olarak gösterilmiştir. Özgüllüğün %65 olmasının; yanlış pozitif bir *cZLR peak*'lerinin şans eseri iki farklı bireyde birden aynı bölgeye lokalize olup yanlış bir aday bölge işaret

etme olasılığının yaklaşık 1:1000 ($0.35 \times 0.35 = 0.1225$) olması nedeniyle gen tanımlanması için önemli bir risk teşkil etmediği düşünülmüştür (11).

3.2.5. Eksom Saptama Tekniğiyle İncelenecek Ailelerin Belirlenmesi

SDNS'e sebep olduğu bilinen genlerde mutasyon taşımadığı gösterilmiş ve ebeveynler arasında akrabalık olduğu bilinen 85 aile, araştırmanın bir önceki basamağında homozigotluk haritalaması ile incelendi. 85 ailenin tümünde hastalığa neden olan geni barındırabileceği düşünülen cZLR *peak*'leri gözlemlendi. Ailelerde en az 8 en fazla 66 tane cZLR *peak*'i gözlemlendi. Bu çalışmada bir ailenin tüm cZLR *peak*'lerinin gösterdiği homozigot segmentlerin toplam genetik uzunluğunun 16 ile 130 megabaz arasında olduğu gözlemlendi. 1 megabazlık bölgede ortalama 6 gen ve 1 gende ortalama 25 eksom olduğu düşünülürse; 16 megabazlık bölgede yaklaşık 96 gen ve 2400 eksom; 130 megabazlık bölgede yaklaşık 780 gen ve 19,500 eksom bulunacaktır. Bu aday genlerin sayıca fazlalığı, veri bankalarının kullanımı ile gen ifade bilgileri, işlevleri ve evrimsel korunumları açısından araştırılarak azaltılmaya çalışılsa bile, mutasyon analiziyle taranması uygun bulunan çok sayıda aday genin varlığını korumasına neden olmaktadır. Bu da bölgedeki aday genlerin DNA dizi analiziyle taranmasını oldukça zahmetli ve pahalı kılmaktadır. Bu nedenle çalışmada, aday gen yaklaşımı yeni genlerin tanımlanması için uygulanabilir bir seçenek olarak görünmemiştir.

Homozigotluk analizlerinde iki veya daha fazla çocuğun ya da kuzenlerin kullanılması, hastalığa sebep olduğu düşünülen geni içeren homozigot bölgenin daraltılmasına yardımcı olmakta ve hatalı lokasyon bulma şansını azaltmaktadır. Bu 85 aile arasından hastalıktan etkilenen iki veya daha fazla çocuğun ya da kuzenlerin olduğu 19 aile bulunmaktadır. Bu nedenle araştırmanın bir sonraki aşamasında eksom saptama tekniğiyle incelenecek aile birden fazla hastalıktan etkilenen kardeşin olduğu bu 19 aile arasından seçilmiştir.

Bu 19 aile arasından bir aile (A 2410) bazı özellikleri açısından dikkat çekmiştir;

- Aile etnik köken olarak Mısır'dan gelmektedir. Mısır, akraba

evliliğinin sık olması nedeniyle resesif hastalıkların sık görüldüğü bir bölgedir.

- Ailede hastalıktan etkilenen iki kardeş bulunmaktadır (A2410-21 ve A2410-22).
- Kardeşler klinik tanılarını erken çocukluk döneminde almışlardır (A2410-21: 5 yaşında; A2410-22: 4 yaşında iken).
- A2410-22'nin, hipospadias (üretral açıklığın penisin ventral yönüne açıldığı konjenital bir defekt) operasyonu öncesinde yapılan rutin idrar analizi sırasında proteinüri'ye sahip olduğu bulunmuştur. A2410-22'nin idrar proteini 790 mg/gün, serum kreatinini: 0.4 mg/dl, serum proteini: 6.5 g/L, serum albumini: 4.2 g/L olarak bulunurken kreatinin klirensi ve C3 seviyesi 2,5 yaş için normal olarak bulunmuştur.
- A2410-21, kardeşinde proteinüri bulunması üzerine test edilmiştir. A2410-21'in idrarda proteini 380 mg/gün, serum kreatinini: 0.4 mg/dl, serum proteini: 6.8 g/L, serum albumini: 3.5 g/L bulunurken kreatinin klirensi ve C3 seviyesi 5 yaş için normal olarak bulunmuştur.
- Her iki kardeş de anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü "angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors" ile tedavi edilmiş ancak idrardan protein kayıplarında herhangi bir azalma olmamıştır. Kardeşlerin her ikisinde de proteinuri miktarı dalgalanmakta, bazen nefrotik sınır olan günde 2 g/gün'e kadar yükselmekte ve herhangi bir tedavi uygulanmadan normale dönmektedir. Ancak kardeşlerde ödem oluşumu gözlenmemiş, immunosüpresif tedavi başlanmamış, renal biyopsi yapılmamıştır.
- A2410-22'nin aynı zamanda 5 aylıktan itibaren kompleks parsiyel nöbet geçirdiği ve bu nedenle karbamazepin ile tedavi edildiği bilinmektedir. Ancak son 1 yıldır karbamazepin tedavisi altında nöbet geçirmemiştir.

Yukarıda belirtilen özellikleri dolayısıyla A2410 ailesi ekson saptama tekniğiyle incelenmek üzere seçilmiştir. A2410-22 bireyinin kan örneğinden izole edilmiş olan DNA miktarının, A2410-21'e kıyasla daha yüksek olması nedeniyle A2410-22 bireyinin ekson saptama ile analize gönderilmesi planlanmıştır.

3.2.6. Ekson Saptama ve Yüksek Ölçekli Dizileme

NimbleGen 2.1M Human Exome Array, konsensus kodlanan DNA dizisinden (*consensus coding sequence*) (*CCDS*) yaklaşık 18,673 protein kodlayan geni oluşturan 180,000 eksonu ve 551 mikro-RNA'yi hedefleyen oligonukleotitler içerir. A2410-22 bireyinin genomik DNA'sı (10 µg) *NimbleGen 2.1M Human Exome Array* (Roche/NimbleGen) ile protokole uygun olarak hizmet alımı ile çalışılmıştır.

Saptanan DNA Parçacıklarının Yüksek Ölçekli Dizileme İçin Hazırlanması

Yakalanan DNA parçacıklarına büyük ölçekli paralel dizileme için gerekli gelişigüzel (*random*) başlangıç pozisyonları oluşturmak, *NimbleGen* bağlantı (*linker*) dizilerini yok etmek ve parçacıkların ölçüsünü Illumina genom analizcisi (*Illumina Genome Analyzer*) için uygun olan boyuta indirgemek için, yakalanmış ve PZR ile çoğaltılmış olan 500-700 baz çifti uzunluğundaki DNA parçacıkları *DNase-1* (Roche) endonükleaz ve *Bal31* (New England Biolabs) eksonükleazlarla modifiye edilmiştir. Modifikasyon şu şekilde yapılmıştır:

- DNA (5 µg) 2 unite *Bal31* eksonükleazla 30°C'de 200 µl'lik reaksiyonda kesildi.
- Reaksiyon son konsantrasyonu 20mM olacak şekilde EGTA eklenerek durduruldu ve hemen takiben 65°C'de 10 dakika süreyle ısıyla inaktivasyonu yapıldı.
- *Qiaquick PCR column purification* (Qiagen) ile saflaştırma yapıldı.
- Elde edilen DNA (yaklaşık 2 µg), 1 unite *DNase-1* (Roche) ve reaksiyon çözeltisi (2Xreaksiyon çözeltisi 20 mMTris-Cl (ph 7.5), 2 mM CaCl₂ ve 20 mM MnCl₂) ile 16°C'de 3 dakika inkübe edilerek

ileri kesime uğratıldı.

- Reaksiyon 2µl EDTA (500 mM) eklenerek durduruldu ve hemen takiben 65°C'de 10 dakika süreyle ısıyla inaktivasyonu yapıldı.

Yüksek Ölçekli Dizileme

DNA parçacıklarından DNA kütüphanesi oluşturulması (*library construction*), *Genomic DNA sample prep kit*, Illumina aracılığıyla üretici firmanın protokolu izlenerek yapıldı. Parçacıklar %1.5'lik agaroz jel üzerinde yürütüldü ve 150-200 baz çifti olacak şekilde parçalara ayrıldı. Parçacıklar saflaştırıldı ve komplementer bağlayıcı özgül primerler kullanılarak PZR çoğaltılması yapıldı. Her bir örneğin miktar ve uzunluğu *Bioanalyzer 2100*, Agilent ile analiz edildi. Tek iplik DNA parçacıkları yüzen bir hücre yüzeyine bir küme istasyonunda bağlandı ve 46 döngü PCR köprü çoğaltılması yapıldı. Parçacıklar *Illumina Genome Analyzer II* platformunda iki sıra halinde dizilendi. Görüntü analizi ve bazların çağırılması (*base calling*) *Genome Analyzer Pipeline 1.5* programının belirli parametreleri kullanılarak yapıldı. Çağrılan her baz için DNA dizi analizi bilgisi ve kalite değerleri Illumina'ya spesifik FASTQ dosyası indirilerek incelendi. Filtrelenmiş yüksek kalitedeki dizilerin insan referans genomu hg19'la karşılaştırılması ve varyantların çağırılması *CLC genomics workbench*, CLC-bio programı aracılığıyla yapıldı.

Homozigotluk Haritalaması ile Eksom Saptama Verilerinin Birleştirilmesi

Araştırmada çocukluk çağı steroide dirençli nefrotik sendroma neden olan yeni bir genin homozigotluk haritalaması tekniği ile eksom saptama/yüksek ölçekli dizileme tekniklerinin birleştirildiği bir yaklaşım ile bulunması planlanmıştır (61). Bunun için homozigotluk haritalaması ve eksom saptama/yüksek ölçekli dizileme teknikleriyle bulunan varyantlar aşağıdaki şekilde filtrelenmiş, daha sonra da iki tekniğin birleştirilmesiyle filtrelenen varyantın mutasyon olma özgüllüğünün artacağı düşünülmüştür.

Homozigotluk haritalaması ile ortaya çıkan çok sayıda homozigot bölgelerin sayısının indirgenmesi için ise hastalıktan etkilenen birden fazla bireyin olduğu ailelerin öncelikle incelenmesi planlanmıştır. Bir aile içinde

hastalıktan etkilenen birden fazla bireyin olması durumunda hastalığa sebep olan mutasyonun, hasta bireylerin hepsinin ortak olarak sahip olduğu homozigot haplotip bloklarında gömülü olması beklenir. Bu düşünceyle hastalıktan etkilenen birden fazla bireyin olduğu ailelerde, kardeşlerin/kuzenlerin homozigotluk haritalaması verilerinin birlikte hesaplanmasıyla, bireylerin homozigot haplotip bloklarının çakıştığı bölgeler gösterilerek hastalığa neden olan genin arandığı genomik bölge daraltılmıştır.

Eksom saptama/yüksek ölçekli dizileme tekniğinin verdiği çok sayıdaki varyantın filtrelenmesi için ise öncelikte varyantlar arasından SNP olarak tanımlanmış olanlar ayrılmıştır. SNP olarak tanımlanmamış varyantlar arasından insersiyon/delesyon ve yanlış anlamlı varyantların hastalığa neden olan mutasyon olma olasılığının yüksek olduğu düşünülmüştür.

Araştırmanın son aşamasında, homozigotluk haritalaması ile eksom saptama/yüksek ölçekli dizileme teknikleriyle ulaşılan veriler, kendi içlerinde bahsedilen şekilde filtrelemeyi takiben birleştirilmiştir. Hastalığa neden olduğu düşünülen varyantın şu kriterlere uyması durumunda, hastalığa neden olan mutasyon olma olasılığının yüksek olduğu düşünülmüştür.

- Eksom saptama/yüksek ölçekli dizileme tekniğiyle referans DNA dizisinden varyant olarak gösterilmiş olması.
- Varyantın hastalıktan etkilenen birden fazla bireyin olduğu ailelerde, kardeşlerin/kuzenlerin homozigotluk haritalaması verilerinin birlikte hesaplanmasıyla, bireylerin homozigot haplotip bloklarının çakıştığı bölgelerde yerleşmiş olarak bulunması.
- Varyantın veri bankalarıyla karşılaştırıldığında SNP olarak tanımlanmamış olması.
- Varyantın insersiyon/delesyon /yanlış anlamlı olması.

4. BULGULAR

4.1. Mutasyon Analizi

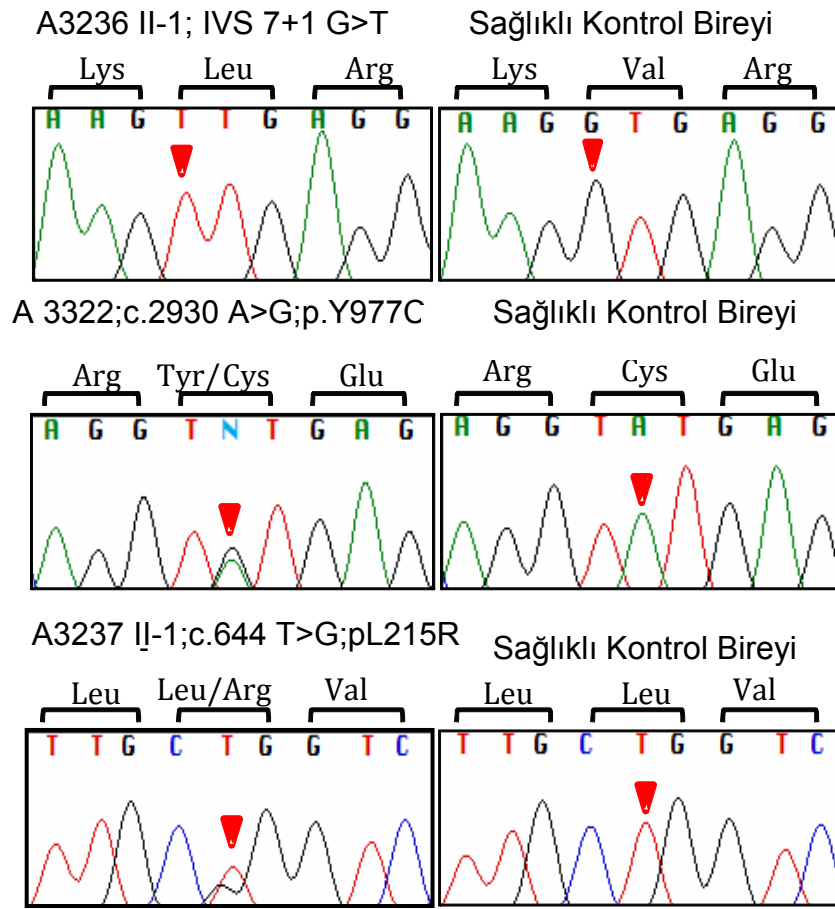
I) Çalışma ile araştırma grubunu oluşturan 2056 ailenin 310'unun (%15) hastalık etyolojisi çocukluk çağı SDNS'ine sebep olan ve otozomal resesif kalıtılan *NPHS1*, *NPHS2*, *LAMB2* ve *PLCE1* bialelik veya dominant kalıtılan *WT1* monoalelik mutasyonlarla açıklanmıştır. Bu veri çocukluk çağı SDNS'inin %15-32'sinin bu 5 gendeki mutasyonlarla açıklandığını belirten önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir (10).

II) Araştırma grubunun içinden SDNS ortaya çıkış yaşı hayatın ilk 3 ayında gerçekleşen (*congenital nephrotic syndrome*) (*CNS*) 27 aile, *NPHS2/podocin* ve *WT1*'e ek olarak *NPHS1* tüm 29 eksonu için DNA dizileme tekniğiyle mutasyon analizine tabi tutulmuştur (SDNS ortaya çıkışı hayatın ilk 3 ayında gerçekleşen hastalarda *NPHS1* mutasyonları %88 oranında görülmektedir) (10). 16 ailenin *NPHS1* bi-alelik mutasyonuna sahip olduğu gösterilmiştir (%60). Bu oran *CNS*'in *NPHS1* mutasyonlarıyla %88 oranında açıklandığını belirten önceki çalışmalardan daha düşük bulunmuştur (42,45). Bu ailelerden 11'i homozigot, 5'i birleşik heterozigot mutasyona sahiptir. Bu çalışmada *NPHS1*'de 3 yeni mutasyon tanımlanmıştır. Yeni mutasyonlar Tablo 4.1'de koyu karakterlerle gösterilmiştir. *NPHS1*'de tanımlanan bir yeni homozigot ve iki yeni heterozigot mutasyon için hasta birey ve sağlıklı kontrol bireyin DNA dizi analizi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. *NPHS1*'de bulunan yeni yanlış anlamalı mutasyonların evrimsel olarak en az *Danio Reiro*'ya kadar korunduğu gösterilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. *NPHS1*'de yeni tanımlanan mutasyonlar.

| Hasta Numarası | <i>NPHS1</i> mutasyonu (Ekson: nükleotit değişikliği; aminoasit değişikliği) |
|---|---|
| <u>Homozigot mutasyonlar</u> | |
| A3236 II-1 | IVS 7nt+1 G>T* |
| <u>Birleşik Heterozigot Mutasyonlar</u> | |
| A3322 II-2 | Ex22: c.2930 A>G; p.Y977C* Ex27: c.3478 C>T; p.R1160X |
| A3322 II-3 | Ex22: c.2930 A>G; p.Y977C Ex27: c.3478 C>T; p.R1160X |
| A3322 II-4 | Ex22: c.2930 A>G; p.Y977C Ex27: c.3478 C>T; p.R1160X |
| A3322 II-5 | Ex22: c.2930 A>G; p.Y977C Ex27: c.3478 C>T; p.R1160X |
| <u>Tek Heterozigot Mutasyonlar</u> | |
| A3237 II-1 | EX6; c. 644 T>G; p. L215R* |

* Bu çalışmada tanımlanan yeni mutasyonlar



Şekil 4.1. *NPHS1*'de yeni tanımlanan mutasyonlar için hasta bireyin ve sağlıklı kontrol bireyin DNA dizi analizi.

Tablo 4.2. *NPHS1*'de yeni tanımlanan yanlış anlamlı mutasyonların evrimsel korunumu.

| <i>NPHS1</i> yeni yanlış anlamlı mutasyonlar | hg18 | Evrimsel Korunum | | | | | | Poly1 | Poly2 | 1,000 genom |
|--|----------|------------------|----|----|-----|----|-----|-------|-------|-----------------|
| | | Mm | Xt | Dr | Ci | Ce | Dm | | | |
| Ekson 22: c.2930 A>G; p.Y977C | 41022158 | Y | Y | Y | Yok | E | Y | 2,565 | 0,994 | Bulunmamaktadır |
| Ekson 6: c. 644 T>G; p.L215R | 41032360 | L | L | L | Yok | L | Y/I | 2,565 | 0,998 | Bulunmamaktadır |

hg 18: NCBI36/hg18 (<http://genome.ucsc.edu>)

Yok: ortolog bulunmamaktadır; Mm: fare; Xt: *X.tropicalis*; Dr: *Danio rerio*; Ci: *Ciona intestinalis*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Poly1: PolyPhen1 değeri (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>); Poly2: PolyPhen 2 değeri (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>); 1,000 genom: 1,000 genom projesi (<http://www.1000genomes.org/>); Polyphen 1 değeri: 0-1.4: hasar verici değil, 1.4-2: düşük ihtimalle hasar verici, >2: yüksek ihtimalle hasar verici; PolyPhen 2 değeri: 0-0.7: hasar verici değil, 0.7-0.9: düşük ihtimalle hasar verici, 0.9-1.0: yüksek ihtimalle hasar verici.

III) Araştırma grubunun tümü, 2056 aile, çocukluk çağı SDNS'inden en yüksek oranda sorumlu olan *NPHS2/podosin* (%10-28) mutasyonları açısından genin tüm 8 eksonunun DNA dizilemesi ile taranmıştır. 237 ailenin *NPHS2* bi-alelik mutasyonuna sahip olduğu gösterilmiştir (%11.5). Bu oran çocukluk çağı SDNS'inin %10-28'inin *NPHS2* mutasyonlarıyla açıklandığını belirten önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir (10). Bu ailelerin 165'i homozigot, 72'si birleşik heterozigot mutasyona sahiptir.

IV) Araştırma grubunun tümü, 2056 aile, çocukluk çağı SDNS'inden ikinci en yüksek oranda sorumlu olan ve diğer çocukluk çağı SDNS'ine neden olan tek gen sebeplerin aksine dominant kalıtılan *WT1* mutasyonları açısından genin 8 ve 9'uncu eksonlarının DNA dizilemesi ile taranmıştır (*WT1* geninin sadece 8 ve 9'uncu eksonundaki mutasyonların SDNS'e sebep olduğu gösterilmiştir) (9). 46 ailenin *WT1* tek alelinde mutasyonuna sahip olduğu gösterilmiştir (%2.2). Bu oran çocukluk çağı SDNS'inin %5'inin *WT1* mutasyonlarıyla açıklandığını belirten önceki çalışmalardan daha düşük bulunmuştur (10).

V) Araştırma grubunun içinden SDNS fenotipi ve böbrek biyopsisi difüz mezanjiyal skleroz histolojisi gösteren 15 aile *NPHS2/podocin* ve *WT1*'e ek olarak *PLCE1*'in tüm 31 eksonu için DNA dizileme tekniğiyle mutasyon analizine tabi tutulmuştur (*PLCE1* mutasyonu, SDNS ve böbrek biyopsisi difüz mezanjiyal skleroz histolojisi gösteren hastalarda gösterilmiştir) (8). 7 ailenin *PLCE1* bi-alelik mutasyonuna sahip olduğu gösterilmiştir (%0.3). Bu oran çocukluk çağı SDNS'inin <%1'inin *PLCE1*'deki mutasyonlarla açıklandığını belirten önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir (10). Bu ailelerin 7'si de homozigot mutasyona sahiptir.

VI) Araştırma grubunun içinden SDNS fenotipi ve böbrek biyopsisi difüz mezanjiyal skleroz histolojisi göstermesine ek olarak Pierson sendromu benzeri göz anomalileri olan 9 aile, *NPHS2/podocin* ve *WT1*'e ek olarak *LAMB2*'nin tüm 32 eksonu için DNA dizileme tekniğiyle mutasyon analizine tabi tutulmuştur (*LAMB2* mutasyonu SDNS ve böbrek biyopsisi difüz mezanjiyal skleroz histolojisi gösteren ve göz anomalileri olan hastalarda gösterilmiştir) (6,7). 4 ailenin *LAMB2* bi-alelik mutasyonuna sahip olduğu

gösterilmiştir (%0.2). Bu oran çocukluk çağı SDNS'inin 1'inin *LAMB2* mutasyonlarıyla açıklandığını belirten önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir (10). Bu bireylerin 2'si homozigot, diğer 2'si birleşik heterozigot mutasyona sahiptir.

4.2. Homozigotluk Haritalaması

I) SDNS'e sebep olan yeni genlerin tanımlanması için, SDNS'e sebep olduğu bilinen genlerdeki mutasyonlar açısından DNA dizi analizi ile taranmış ve mutasyon taşımadığı görülmüş 1746 aile arasından, ebeveynler arasında akrabalık olduğu bilinen 85 aile homozigotluk haritalaması tekniğiyle *Affymetrix 250K (Styl)* SNP çip ile taranmıştır. 85 ailenin tümünde hastalığa neden olan geni barındırabileceği düşünülen cZLR *peak*'leri gözlenmiştir. Ailelerde en az 8 en fazla 66 tane cZLR *peak*'i gözlenmiştir. Bu veri, resesif tek gen mutasyonu nedeniyle böbrek hastalığına sahip olan ve ebeveynlerin akraba olduğu bilinen ailelerden gelen bireylerin homozigotluk haritalaması sonucu minimum 8 maksimum 60 cZLR *peak*'i bulunduğu gösterildiği daha önceki bir çalışmayla uyumluluk göstermektedir (11).

II) Şimdiye kadar homozigotluk haritalaması tekniğiyle yeni gen tanımlamaları daha çok ebeveynler arasında akrabalık olan ailelerde başarılmıştır. Ebeveynlerin yakın akraba olması durumunda hastalıktan etkilenen çocuklarda oluşan uzun homozigot segmentler bölgenin SNP genetik belirleyici setleriyle belirlenmesini kolaylaştırır. Ancak bu durumda hasta bireyde homozigot segmentlerin çok sayıda ve uzun segmentler halinde olması, çok sayıda pozisyonel aday gen ortaya çıkmasına neden olmakta ve mutasyon analizi ile verimli gen tanımlanmasını güçleştirmektedir.

III) Bu çalışmada ailelerin tüm cZLR *peak*'lerinin gösterdiği homozigot segmentlerin toplam genetik uzunluğunun 16 ile 130 megabaz arasında olduğu gözlenmiştir. 1 megabazlık bölgede ortalama 6 gen ve 1 gende ortalama 25 ekson olduğu düşünülürse; 16 megabazlık bölgede yaklaşık 96 gen ve 2400 ekson; 130 megabazlık bölgede yaklaşık 780 gen ve 19,500 ekson bulunacaktır. Bu aday genlerin sayısı veri bankasının kullanımı ile gen ifade bilgileri, işlevleri ve evrimsel korunumları açısından araştırılarak azaltılmaya çalışılsa bile, mutasyon analiziyle taranması uygun bulunan çok

sayıda aday genin varlığını koruması, bölgedeki aday genlerin DNA dizi analiziyle taranmasını oldukça zahmetli ve pahalı kılmaktadır ve bu nedenle yeni genlerin tanımlanması için uygulanabilir bir seçenek olarak görünmemektedir. Bu açıdan pozisyona bağlı klonlama tekniğinin, tamamının analizine imkan vermeyecek ölçüde fazla sayıda aday gen vermesi nedeniyle resesif hastalıklarda yeni gen tanımlaması amacıyla yapılmış önceki çalışmalarda karşılaşılan zorluk, bu çalışmada da gözlenmiştir.

4.3. Eksom Saptama ve Yüksek Ölçekli Dizileme

I) A2410-22 bireyinin genomik DNA'sının *NimbleGen 2.1M Human Exome Array*, Roche/NimbleGen ile saptanması ile hedeflenen eksonlarda yaklaşık 200 kat çoğalma sağlanmıştır.

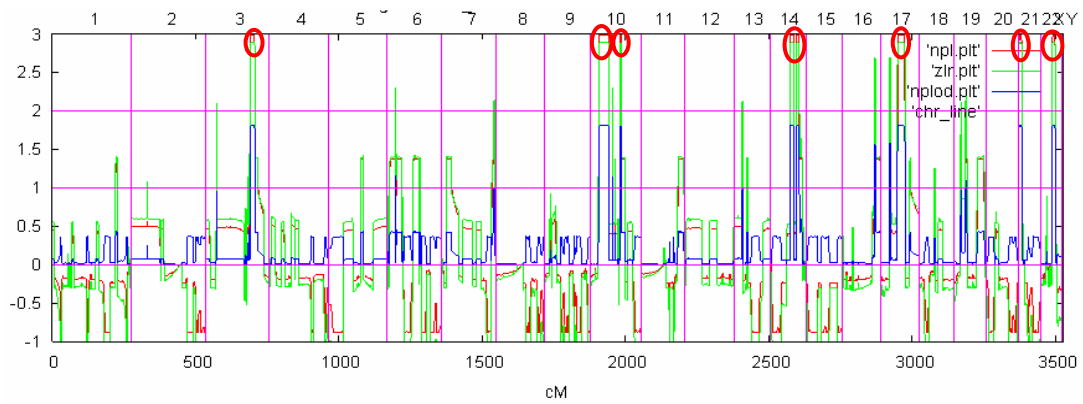
II) Saptanmış ve düzenlenmiş DNA parçacıklarının *Illumina Genome Analyzer II* platformunda iki sıra (*lane*) halinde dizilenmesi sonucunda 78 bazçifti uzunluğunda 29.5 milyon tek uçlu okuma vermiştir.

III) Filtrelenmiş yüksek kalitedeki okumaların 20.1 milyonu (%68) hedeflenen eksonlarla eşleşmiştir. Ortalama kapsanma (coverage):14 kat; ortanca kapsanma: 11 kat olarak bulunmuştur. Hedeflenen tüm 180,000 eksonun yalnızca %2.2'si kapsanmamıştır. Bunu takiben *CLC genomics workbench* yazılımı tek nükleotit varyantların veya kısa insersiyon/delesyonların çağrılması için kullanılmıştır. Homozigot varyantları tespit etmek üzere tüm varyantlar arasından sadece alel frekansı %80'den fazla olanlar çağrılmıştır. Bu şekilde varyantlardan sadece homozigot olanlar çağrıldığında, referans DNA dizisinden farklı 1968 varyant bulunmuştur. Bu varyant DNA dizilerinin en az 5 kez kapsandığı görülmüştür.

4.4. Homozigotluk Haritalaması ile Eksom Saptama ve Yüksek Ölçekli Dizileme Verilerinin Birleştirilmesi

I) A2410-21 ve A2410-22 kardeşleri için parametrik olmayan LOD değerleri, iki kardeş birlikte olarak hesaplanmıştır. Bu durumda kromozom 3, 10 (iki farklı bölge), 14, 17, 21 ve 22'de ortak atadan kalıtılarak homozigotluğu (*homozygosity by descent*) işaret eden 7 adet cZLR *peak*'i bulunmuştur (Şekil 4.2). Bu bölgelerin toplam genetik uzunluğu 132

megabazdır. ALOHOMORA dosyasının vardığı cZLR *peak* değerleri ile homozigotluk haritalarının karşılaştırılması Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Tablo 4.3'te görüldüğü üzere cZLR *peak* değerleri ile homozigotluk haritasında gözlemlenen bölgelerin genetik sınırları birbirine çok yakındır. Kromozom 10'daki homozigot segment bilinen bir SDNS geni olan *PLCE1*'in genomik lokasyonu ile çakıştığı için, A2410-22 bireyinde *PLCE1* geninin tüm ekson ve ekson-intron sınırları DNA dizi analiziyle incelenmiş ve *PLCE1*'de mutasyon olmadığı gösterilmiştir.



Şekil 4.2. A2410-21 ve A2410-22 bireylerinin birlikte hesaplanan parametrik olmayan LOD değerlerinin işaret ettiği homozigot bölgeler.

Tablo 4.3. A2410-21 ve A2410-22 bireylerinin birlikte hesaplanması ile bulunan cZLR *peak* değerleri ile homozigotluk haritalarının karşılaştırılması.

| Kromozom | cZLR tepeciği yerleşimi | hg18 | Homozigot Haritalama | hg18 |
|----------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 3 | SNP_A-2245942;SNP_A-2138025 | chr3:148,711,176-172,553,190 | SNP_A-1791351;SNP_A-1975292 | chr3:148,849,491-172,210,602 |
| 10 | SNP_A-1878776;SNP_A-1847037 | chr10:12,617,549-51,676,508 | SNP_A-1929058;SNP_A-1829234 | chr10:13,136,847-51,753,316 |
| 10 | SNP_A-2226858;SNP_A-2184858 | chr10:88,468,509-93,291,658 | SNP_A-2209474;SNP_A-2184858 | chr10:88,396,785-93,291,658 |
| 14 | SNP_A-2230087;SNP_A-1928442 | chr14:70,656,151-99,567,660 | SNP_A-2174145;SNP_A-1934838 | chr14:72,197,643-95,649,438 |
| 17 | SNP_A-1848230;SNP_A-2287159 | chr17:29,037,118-53,370,922 | SNP_A-2151776;SNP_A-1864466 | chr17:29,201,322-53,203,215 |
| 21 | SNP_A-4270134;SNP_A-2015929 | chr21:13,705,906-19,319,704 | SNP_A-2015094;SNP_A-4270208 | chr21:9,941,639-18,850,259 |
| 22 | SNP_A-1910898;SNP_A-2305001 | chr22:34,459,547-44,061,458 | SNP_A-2236421;SNP_A-4279733 | chr22:35,031,996-43,683,022 |

II) A2410-22'nin eksom saptama tekniğiyle incelenmesi sonucu referans dizilerinden farklı, en az az 5 kez kapsanan ve yalnızca homozigot olan 1968 varyant bulunmuştur. Bunlar arasından 48 tanesi veri bankalarında SNP olarak tanımlanmamıştır.

Eksom saptama tekniğiyle ortaya çıkarılan varyantlar arasından homozigotluk haritalaması ile homozigot olduğu gösterilmiş bölgelere filtrelenen varyantlar Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Bunlar arasından 11 tanesinin sinonim olmadığı gözlenmiştir. Sinonim olmayan varyantlar Tablo 4.4'te sarı renkle işaretlenmiştir. Bu varyantlardan sadece 1 tanesi (*CUBN*) insersiyon/delesyon varyasyondur. *CUBN* varyantı Tablo 4.4'te kırmızı renkle işaretlenmiştir.

Şekil 4.3'te *CLC* yazılımı *CUBN* 53'üncü eksondaki bir baz çifti uzunluğundaki homozigot delesyonu (c.8355 delA) göstermektedir. Şekilin yukarısındaki DNA dizisi kromozom 10'un pozitif ipliğini göstermektedir, ancak *CUBN* negatif iplikte kodlandığı için, *CUBN* bir baz çifti uzunluğundaki adenin (A) delesyonu, timin (T) delesyonu şeklinde gözükmektedir. Bu sayede *CUBN* (cubilin) geni 53'üncü eksondaki bir bazçifti homozigot delesyonun (c.8355delA) çerçeve kaymasına neden olarak kodlanan proteinin erken sonlanmasından (p.S2785fsX19) sorumlu olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.4. A2410-22'nin eksom saptama tekniğiyle incelenmesi ile elde edilen varyantlar arasından homozigotluk haritalaması ile homozigot olduğu gösterilmiş bölgelere filtrelenen varyantlar.

| Homozigotluk | Frekans | Krom. Pozis. | Gen | Kr. | Ref. | Kapsama | Skor | A(%) | C(%) | G(%) | T(%) | Ins(%) | Del(%) | Genotip | Mut. Aa Değişimi | SNP Yerleşim |
|--------------|---------|--------------|-----------|-----|------|---------|------|------|------|------|------|--------|--------|------------|------------------|---------------|
| Başlangıç | 100 | 147367051 | rs4387937 | 3 | | | | | | | | | 100 | | | SNP_A-1791351 |
| 12344 | 100 | 148760346 | HLTF | 3 | C | | 9 | 15 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 12346 | 100 | 148857690 | HPS3 | 3 | C | | 7 | 11 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 12350 | 100 | 148868279 | HPS3 | 3 | G | | 10 | 16 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 12399 | 91,67 | 151165342 | IGSF10 | 3 | C | | 12 | 21 | 0 | 8,33 | 0 | 92 | 0 | TT | C>T 809P>P | |
| 12467 | 92,31 | 157154660 | PTX3 | 3 | A | | 39 | 24 | 2,56 | 0 | 92,3 | 0 | 0 | 5,13 GG | A>G | |
| 12492 | 100 | 160102487 | IFT80 | 3 | C | | 5 | 4 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 12493 | 100 | 160149791 | SMC4 | 3 | C | | 8 | 14 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 12497 | 83,33 | 164906320 | SLITRK3 | 3 | A | | 6 | 8 | 0 | 16,7 | 0 | 83 | 0 | TT | A>T 767S>T | |
| 12499 | 83,33 | 166409002 | LOC10028 | 3 | C | | 6 | 13 | 0 | 16,7 | 0 | 83 | 0 | TT | C>T | |
| 12500 | 100 | 166409164 | LOC10028 | 3 | G | | 4 | 7 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 12532 | 83,33 | 170523982 | | 3 | T | | 6 | 5 | 0 | 0 | 83,3 | 17 | 0 | GG | T>G | |
| 12533 | 83,33 | 170523994 | | 3 | A | | 6 | 4 | 16,7 | 0 | 0 | 83 | 0 | TT | A>T | |
| 12534 | 83,33 | 170523999 | | 3 | A | | 6 | 3 | 16,7 | 0 | 83,3 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 12535 | 83,33 | 170524000 | | 3 | G | | 6 | 3 | 0 | 83,3 | 16,7 | 0 | 0 | CC | G>C | |
| 12536 | 83,33 | 170524008 | | 3 | C | | 6 | 3 | 0 | 16,7 | 0 | 83 | 0 | TT | C>T | |
| 12537 | 83,33 | 170524009 | | 3 | A | | 6 | 3 | 16,7 | 0 | 83,3 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 12538 | 83,33 | 170524011 | | 3 | G | | 6 | 4 | 83,3 | 0 | 16,7 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 12540 | 100 | 170524052 | | 3 | C | | 4 | 2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| Son | 100 | 170727658 | rs1051368 | 3 | | | | | | | | | 100 | | | SNP_A-1975292 |
| Başlangıç | 100 | 13097091 | rs1125815 | 10 | | | | | | | | | 100 | | | SNP_A-1929058 |
| 27640 | 100 | 13647614 | PRPF18 | 10 | T | | 5 | 3 | 0 | 0 | 100 | 60 | 0 | insC | insC | |
| 27668 | 100 | 14941186 | SUV39H2 | 10 | G | | 7 | 11 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 27692 | 83,33 | 16942679 | CUBN | 10 | T | | 6 | 5 | 0 | 0 | 16,7 | 0 | 0 | 83,33 delT | delT FS | |
| 27696 | 85,71 | 16949924 | CUBN | 10 | A | | 7 | 6 | 0 | 0 | 14,3 | 86 | 0 | TT | A>T | |
| 27703 | 100 | 17157779 | CUBN | 10 | G | | 9 | 10 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 27719 | 100 | 17735210 | STAM | 10 | T | | 11 | 19 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 27722 | 100 | 17756964 | STAM | 10 | C | | 4 | 7 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 27725 | 100 | 17840645 | FAM23A | 10 | G | | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | delGT | delGT | |
| 27730 | 90 | 17887618 | MRC1L1 | 10 | G | | 10 | 21 | 90 | 0 | 10 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 27734 | 100 | 17905716 | MRC1L1 | 10 | G | | 13 | 23 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | TT | G>T | |
| 27737 | 100 | 17949976 | MRC1L1 | 10 | G | | 4 | 12 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 27740 | 100 | 18098134 | | 10 | A | | 7 | 8 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | |
| 27741 | 100 | 18134547 | MRC1 | 10 | G | | 8 | 17 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 27745 | 100 | 18169745 | MRC1 | 10 | A | | 4 | 7 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 27756 | 90,91 | 18331540 | SLC39A12 | 10 | G | | 11 | 11 | 0 | 90,9 | 9,09 | 0 | 0 | CC | G>C | |
| 27798 | 100 | 25886727 | GPR158 | 10 | A | | 6 | 9 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | GG | A>G 724Q>Q | |
| 27805 | 100 | 26923693 | | 10 | A | | 5 | 8 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 27806 | 100 | 26964853 | | 10 | G | | 4 | 2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 100 | insA | insA | |
| 27840 | 100 | 28223714 | ARMC4 | 10 | G | | 7 | 11 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 27855 | 100 | 29751520 | SVIL | 10 | C | | 5 | 8 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 27912 | 100 | 33779957 | | 10 | G | | 4 | 2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | |
| 27919 | 100 | 35464881 | CREM | 10 | C | | 4 | 3 | 0 | 100 | 0 | 0 | 75 | insATT | insATT | |
| 27948 | 87,5 | 38774468 | | 10 | A | | 8 | 8 | 0 | 0 | 87,5 | 0 | 0 | 12,5 GG | A>G | |
| 27949 | 100 | 38774477 | | 10 | T | | 8 | 7 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 27950 | 100 | 38774481 | | 10 | T | | 9 | 8 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | |
| 27951 | 100 | 38774483 | | 10 | C | | 9 | 7 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 27952 | 88,89 | 38774487 | | 10 | A | | 9 | 6 | 11,1 | 0 | 0 | 89 | 0 | TT | A>T | |
| 27953 | 100 | 38774489 | | 10 | C | | 9 | 8 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 27962 | 81,82 | 38775949 | | 10 | G | | 11 | 11 | 0 | 18,2 | 0 | 82 | 0 | TT | G>T | |
| 27963 | 85,71 | 38775954 | | 10 | C | | 14 | 11 | 0 | 0 | 14,3 | 86 | 0 | TT | C>T | |
| 27973 | 82,22 | 38778085 | | 10 | C | | 180 | 21 | 1,11 | 12,2 | 82,2 | 1,1 | 0,56 | 3,33 GG | C>G | |
| 27975 | 82 | 38778145 | | 10 | G | | 250 | 23 | 82 | 2 | 15,6 | 0,4 | 0 | AA | G>A | |
| 27981 | 100 | 38779190 | | 10 | C | | 6 | 9 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 27984 | 90 | 38779278 | | 10 | C | | 10 | 15 | 90 | 10 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 27991 | 83,33 | 38780703 | | 10 | C | | 24 | 11 | 12,5 | 83,3 | 0 | 4,2 | 79,17 | insT | insT | |
| 27992 | 87,5 | 38780705 | | 10 | A | | 24 | 11 | 4,17 | 8,33 | 87,5 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 27993 | 83,33 | 38780709 | | 10 | T | | 24 | 12 | 4,17 | 4,17 | 83,3 | 8,3 | 0 | GG | T>G | |
| 27994 | 83,33 | 38780713 | | 10 | A | | 24 | 15 | 12,5 | 0 | 4,17 | 0 | 0 | 83,33 delA | delA | |
| 28005 | 90 | 38791730 | | 10 | C | | 10 | 14 | 90 | 10 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 28007 | 92,86 | 38791780 | | 10 | G | | 14 | 19 | 92,9 | 0 | 7,14 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 28008 | 85,71 | 38791784 | | 10 | G | | 14 | 15 | 0 | 85,7 | 14,3 | 0 | 0 | CC | G>C | |
| 28009 | 87,5 | 38791789 | | 10 | G | | 8 | 7 | 87,5 | 0 | 12,5 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 28010 | 100 | 38791791 | | 10 | G | | 6 | 6 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |

| Homozigotluk | Frekans | Krom. Pozis. | Gen | Kr. | Ref. | Kapsama | Skor | A(%) | C(%) | G(%) | T(%) | Ins(%) | Del(%) | Genotip | Mut. Aa Değişimi | SNP Yerleşim |
|--------------|---------|--------------|-----|-----|------|---------|------|------|------|------|------|--------|--------|---------|------------------|--------------|
| 28011 | 100 | 38791794 | | 10 | C | 5 | 5 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 28012 | 100 | 38791795 | | 10 | T | 5 | 6 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | T>G | |
| 28013 | 100 | 38791796 | | 10 | T | 5 | 6 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | |
| 28015 | 100 | 38794960 | | 10 | C | 4 | 6 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 28016 | 85,71 | 38794966 | | 10 | G | 7 | 9 | 0 | 85,7 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | |
| 28017 | 85,71 | 38794967 | | 10 | G | 7 | 9 | 85,7 | 0 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 28024 | 83,33 | 38794991 | | 10 | A | 12 | 14 | 8,33 | 8,33 | 83,3 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 28026 | 100 | 38795042 | | 10 | G | 4 | 7 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 28027 | 100 | 38795044 | | 10 | A | 4 | 7 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | |
| 28031 | 83,33 | 38798346 | | 10 | C | 6 | 8 | 0 | 16,7 | 83,3 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 28032 | 100 | 38798352 | | 10 | C | 4 | 12 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 28033 | 83,33 | 38804333 | | 10 | C | 6 | 7 | 0 | 0 | 16,7 | 0 | 0 | 83,33 | delC | delC | |
| 28035 | 83,33 | 38804428 | | 10 | A | 6 | 4 | 0 | 16,7 | 0 | 83 | 0 | 0 | TT | A>T | |
| 28051 | 83,33 | 38813185 | | 10 | C | 6 | 7 | 0 | 0 | 83,3 | 0 | 0 | 16,67 | GG | C>G | |
| 28052 | 85,71 | 38813228 | | 10 | C | 7 | 9 | 85,7 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 28083 | 100 | 38869566 | | 10 | G | 9 | 10 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | |
| 28084 | 100 | 38869567 | | 10 | T | 9 | 10 | 0 | 0 | 100 | 0 | 33,33 | 0 | GG | T>G | |
| 28085 | 100 | 38869578 | | 10 | G | 9 | 11 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 28086 | 88,89 | 38869579 | | 10 | C | 9 | 6 | 88,9 | 0 | 11,1 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 28087 | 87,5 | 38869582 | | 10 | G | 8 | 9 | 87,5 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 28088 | 100 | 38869596 | | 10 | G | 6 | 9 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | |
| 28091 | 83,33 | 38869929 | | 10 | A | 6 | 3 | 16,7 | 0 | 0 | 83 | 0 | 0 | TT | A>T | |
| 28092 | 83,33 | 38869934 | | 10 | C | 6 | 3 | 83,3 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 28093 | 83,33 | 38869935 | | 10 | C | 6 | 3 | 83,3 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 28094 | 83,33 | 38869936 | | 10 | C | 6 | 3 | 0 | 16,7 | 83,3 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 28095 | 83,33 | 38869941 | | 10 | G | 6 | 4 | 83,3 | 0 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 28096 | 100 | 38869979 | | 10 | C | 5 | 4 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 28097 | 100 | 38869984 | | 10 | G | 5 | 4 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 28102 | 89,74 | 38872183 | | 10 | C | 39 | 16 | 0 | 10,3 | 0 | 90 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 28103 | 86,67 | 38872187 | | 10 | C | 30 | 20 | 86,7 | 6,67 | 0 | 3,3 | 0 | 3,33 | AA | C>A | |
| 28106 | 100 | 38872217 | | 10 | C | 5 | 4 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 28110 | 83,33 | 38873841 | | 10 | A | 6 | 7 | 16,7 | 0 | 83,3 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 28115 | 100 | 38874520 | | 10 | A | 4 | 2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 28117 | 83,33 | 38877629 | | 10 | A | 6 | 7 | 0 | 0 | 83,3 | 17 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 28118 | 88,89 | 38880452 | | 10 | T | 9 | 11 | 88,9 | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 | AA | T>A | |
| 28119 | 81,82 | 38880460 | | 10 | T | 11 | 10 | 0 | 81,8 | 0 | 9,1 | 0 | 9,09 | CC | T>C | |
| 28120 | 100 | 38880465 | | 10 | T | 10 | 13 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | |
| 28121 | 100 | 38880466 | | 10 | C | 10 | 13 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 28122 | 100 | 38880467 | | 10 | G | 10 | 13 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 28123 | 81,82 | 38880511 | | 10 | T | 11 | 13 | 0 | 81,8 | 0 | 18 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 28124 | 90,91 | 38880513 | | 10 | A | 11 | 14 | 9,09 | 0 | 90,9 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 28125 | 90 | 38880518 | | 10 | C | 10 | 11 | 0 | 10 | 90 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 28126 | 87,5 | 38880524 | | 10 | A | 8 | 10 | 12,5 | 0 | 0 | 88 | 0 | 0 | TT | A>T | |
| 28127 | 87,5 | 38880525 | | 10 | T | 8 | 10 | 0 | 87,5 | 0 | 13 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 28137 | 100 | 38881541 | | 10 | C | 22 | 25 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 28138 | 100 | 38881542 | | 10 | A | 22 | 23 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 28139 | 95,24 | 38881552 | | 10 | G | 21 | 23 | 0 | 95,2 | 0 | 4,8 | 0 | 0 | CC | G>C | |
| 28140 | 95 | 38881554 | | 10 | A | 20 | 25 | 0 | 0 | 95 | 5 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 28141 | 100 | 38881568 | | 10 | A | 18 | 22 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 28142 | 100 | 38881576 | | 10 | G | 17 | 22 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | |
| 28143 | 93,33 | 38881577 | | 10 | T | 15 | 22 | 6,67 | 93,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 28144 | 100 | 38881601 | | 10 | C | 7 | 7 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 28145 | 100 | 38881603 | | 10 | C | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 28146 | 100 | 38881605 | | 10 | A | 7 | 7 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | |
| 28147 | 90 | 38881619 | | 10 | C | 10 | 13 | 90 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 28148 | 100 | 38881620 | | 10 | C | 11 | 15 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 28151 | 100 | 38881675 | | 10 | T | 6 | 5 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 28153 | 100 | 38881751 | | 10 | G | 4 | 7 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 28154 | 100 | 38881752 | | 10 | G | 4 | 6 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 28155 | 100 | 38881762 | | 10 | G | 7 | 10 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 28157 | 83,33 | 38881806 | | 10 | A | 6 | 5 | 16,7 | 0 | 83,3 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 28160 | 81,25 | 38881927 | | 10 | A | 32 | 21 | 15,6 | 3,12 | 81,3 | 0 | 3,12 | 0 | GG | A>G | |
| 28161 | 94,5 | 38881936 | | 10 | G | 109 | 20 | 0,92 | 0,92 | 2,75 | 95 | 0 | 0,92 | TT | G>T | |
| 28163 | 86,51 | 38881945 | | 10 | C | 126 | 18 | 0 | 12,7 | 0,79 | 87 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 28178 | 88,89 | 38887047 | | 10 | G | 9 | 9 | 88,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11,11 | AA | G>A | |
| 28179 | 92,31 | 38887053 | | 10 | G | 13 | 8 | 92,3 | 0 | 7,69 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 28203 | 100 | 39078898 | | 10 | C | 7 | 6 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 28204 | 100 | 39078900 | | 10 | T | 7 | 6 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | insA | insA | |
| 28222 | 83,33 | 39081642 | | 10 | A | 12 | 17 | 0 | 8,33 | 0 | 8,3 | 0 | 83,33 | delA | delA | |
| 28223 | 100 | 39083218 | | 10 | A | 7 | 8 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | |
| 28224 | 85,71 | 39083219 | | 10 | A | 7 | 7 | 0 | 85,7 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | |
| 28226 | 100 | 39083224 | | 10 | A | 7 | 8 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | |
| 28227 | 88,89 | 39083227 | | 10 | T | 9 | 8 | 0 | 88,9 | 0 | 11 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 28234 | 83,33 | 39083892 | | 10 | T | 6 | 8 | 0 | 83,3 | 0 | 17 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 28236 | 85,71 | 39083896 | | 10 | T | 7 | 5 | 14,3 | 0 | 0 | 86 | 57,14 | 0 | insG | insG | |
| 28249 | 100 | 39099389 | | 10 | G | 8 | 8 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | |
| 28250 | 100 | 39099395 | | 10 | A | 8 | 9 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | |
| 28251 | 100 | 39099410 | | 10 | A | 8 | 9 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | |
| 28252 | 87,5 | 39099411 | | 10 | T | 8 | 8 | 87,5 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | AA | T>A | |

| Homozigotluk | Frekans | Krom. Pozis. | Gen | Kr. | Ref. | Kapsama | Skor | A(%) | C(%) | G(%) | T(%) | Ins(%) | Del(%) | Genotip | Mut. | Aa Değişimi | SNP Yerleşim |
|--------------|---------|--------------|-----|-----|------|---------|------|------|------|------|------|--------|--------|---------|------|-------------|--------------|
| 28254 | 87,5 | 39099451 | | 10 | T | 8 | 7 | 87,5 | 12,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28269 | 96,15 | 39101955 | | 10 | G | 26 | 20 | 0 | 0 | 3,85 | 96 | 0 | 0 | TT | G>T | | |
| 28277 | 100 | 39103204 | | 10 | A | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28278 | 100 | 39103208 | | 10 | T | 7 | 7 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28279 | 100 | 39103213 | | 10 | A | 6 | 4 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28280 | 83,33 | 39103219 | | 10 | T | 6 | 4 | 0 | 83,3 | 0 | 17 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28281 | 83,33 | 39103221 | | 10 | C | 6 | 4 | 0 | 16,7 | 83,3 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | | |
| 28286 | 89,47 | 39107350 | | 10 | A | 38 | 15 | 10,5 | 0 | 89,5 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 28287 | 94,74 | 39107351 | | 10 | A | 38 | 15 | 2,63 | 2,63 | 0 | 95 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28292 | 100 | 39107413 | | 10 | C | 4 | 6 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | | |
| 28293 | 100 | 39107991 | | 10 | G | 6 | 6 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | | |
| 28304 | 85,71 | 39111255 | | 10 | T | 7 | 11 | 0 | 0 | 85,7 | 14 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 28305 | 85,71 | 39111256 | | 10 | G | 7 | 11 | 85,7 | 0 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 28329 | 93,55 | 39112809 | | 10 | G | 62 | 25 | 3,23 | 93,6 | 1,61 | 0 | 0 | 1,61 | CC | G>C | | |
| 28333 | 86,05 | 39112829 | | 10 | T | 43 | 20 | 6,98 | 86,1 | 0 | 4,7 | 0 | 0 | 2,33 | CC | T>C | |
| 28335 | 100 | 39112838 | | 10 | A | 7 | 8 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28342 | 100 | 39119046 | | 10 | G | 4 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 28343 | 100 | 39119048 | | 10 | G | 4 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 28345 | 100 | 39121392 | | 10 | A | 24 | 21 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 28346 | 94,59 | 39121398 | | 10 | G | 37 | 22 | 0 | 94,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5,41 | CC | G>C | |
| 28349 | 93,18 | 39121412 | | 10 | A | 88 | 19 | 2,27 | 0 | 0 | 93 | 0 | 4,55 | TT | A>T | | |
| 28354 | 92,78 | 39121478 | | 10 | G | 97 | 19 | 92,8 | 1,03 | 6,19 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 28355 | 95,79 | 39121480 | | 10 | G | 95 | 18 | 95,8 | 0 | 2,11 | 0 | 0 | 2,11 | AA | G>A | | |
| 28356 | 85,71 | 39121481 | | 10 | T | 91 | 15 | 1,1 | 85,7 | 1,1 | 11 | 0 | 1,1 | CC | T>C | | |
| 28360 | 100 | 39121557 | | 10 | G | 4 | 7 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 28361 | 100 | 39121573 | | 10 | G | 4 | 6 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 28362 | 100 | 39121582 | | 10 | T | 4 | 6 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 28369 | 100 | 39122534 | | 10 | A | 7 | 9 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28370 | 100 | 39122573 | | 10 | T | 9 | 16 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28372 | 100 | 39122577 | | 10 | C | 8 | 13 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | | |
| 28373 | 100 | 39122585 | | 10 | A | 6 | 11 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 28378 | 100 | 39125543 | | 10 | A | 7 | 11 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 28388 | 87,5 | 39125645 | | 10 | C | 24 | 21 | 87,5 | 8,33 | 0 | 4,2 | 8,33 | 0 | AA | C>A | | |
| 28389 | 85 | 39125646 | | 10 | T | 20 | 18 | 0 | 85 | 0 | 15 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28390 | 100 | 39125838 | | 10 | T | 5 | 8 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 28395 | 100 | 39125900 | | 10 | G | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | | |
| 28396 | 100 | 39125901 | | 10 | T | 5 | 3 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28398 | 100 | 39128084 | | 10 | G | 5 | 7 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | | |
| 28399 | 100 | 39128085 | | 10 | G | 5 | 7 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | | |
| 28400 | 100 | 39128088 | | 10 | A | 5 | 7 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28410 | 100 | 39130196 | | 10 | A | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28412 | 100 | 39130202 | | 10 | A | 4 | 1 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 28413 | 100 | 39130203 | | 10 | T | 4 | 1 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 28420 | 87,5 | 39136738 | | 10 | A | 8 | 8 | 12,5 | 0 | 0 | 88 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28429 | 83,33 | 39137285 | | 10 | A | 6 | 7 | 16,7 | 0 | 83,3 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 28435 | 94,07 | 39138129 | | 10 | T | 118 | 17 | 0,85 | 0,85 | 94,1 | 2,5 | 0,85 | 1,69 | GG | T>G | | |
| 28436 | 88,43 | 39138130 | | 10 | C | 121 | 16 | 1,65 | 7,44 | 88,4 | 0 | 0 | 2,48 | GG | C>G | | |
| 28445 | 100 | 39139456 | | 10 | T | 4 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28446 | 85,71 | 39139457 | | 10 | C | 7 | 7 | 85,7 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | | |
| 28451 | 100 | 39139548 | | 10 | C | 9 | 9 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | | |
| 28459 | 84,62 | 39144169 | | 10 | T | 39 | 16 | 2,56 | 84,6 | 2,56 | 10 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28461 | 93,62 | 39144181 | | 10 | T | 47 | 23 | 0 | 2,13 | 93,6 | 2,1 | 0 | 2,13 | GG | T>G | | |
| 28462 | 93,88 | 39144184 | | 10 | C | 49 | 17 | 4,08 | 0 | 2,04 | 94 | 2,04 | 0 | TT | C>T | | |
| 28465 | 100 | 39144242 | | 10 | G | 12 | 15 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 28469 | 100 | 39144254 | | 10 | A | 5 | 7 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28475 | 84,78 | 39146046 | | 10 | C | 46 | 19 | 84,8 | 8,7 | 0 | 2,2 | 0 | 4,35 | AA | C>A | | |
| 28476 | 86,79 | 39146049 | | 10 | T | 53 | 18 | 1,89 | 3,77 | 86,8 | 5,7 | 0 | 1,89 | GG | T>G | | |
| 28482 | 88,24 | 39146119 | | 10 | G | 34 | 22 | 0 | 88,2 | 11,8 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | | |
| 28497 | 83,33 | 39148478 | | 10 | A | 6 | 4 | 16,7 | 0 | 83,3 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 28499 | 100 | 39148484 | | 10 | T | 4 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28501 | 100 | 39150316 | | 10 | G | 4 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 28503 | 100 | 39150368 | | 10 | T | 6 | 5 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 28505 | 100 | 39150378 | | 10 | T | 8 | 9 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 28506 | 100 | 39150382 | | 10 | A | 8 | 9 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28509 | 100 | 39150402 | | 10 | G | 6 | 9 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | | |
| 28511 | 93,75 | 39150578 | | 10 | G | 16 | 16 | 0 | 0 | 6,25 | 0 | 0 | 93,75 | delG | delG | | |
| 28512 | 93,75 | 39150582 | | 10 | T | 16 | 16 | 0 | 93,8 | 0 | 0 | 0 | 6,25 | CC | T>C | | |
| 28513 | 100 | 39150584 | | 10 | G | 16 | 16 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | | |
| 28515 | 93,75 | 39150590 | | 10 | A | 16 | 9 | 93,8 | 6,25 | 0 | 0 | 62,5 | 0 | insT | insT | | |
| 28516 | 81,25 | 39150599 | | 10 | C | 16 | 13 | 6,25 | 6,25 | 81,3 | 6,3 | 0 | 0 | GG | C>G | | |
| 28519 | 90 | 39150611 | | 10 | G | 10 | 10 | 90 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 28520 | 100 | 39150613 | | 10 | T | 7 | 10 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 28529 | 85,71 | 39152021 | | 10 | A | 7 | 6 | 14,3 | 0 | 85,7 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 28530 | 83,33 | 39152480 | | 10 | T | 6 | 4 | 0 | 0 | 83,3 | 17 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 28531 | 83,33 | 39152481 | | 10 | G | 6 | 4 | 0 | 83,3 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | | |
| 28549 | 80,81 | 42356793 | | 10 | A | 99 | 23 | 17,2 | 80,8 | 1,01 | 1 | 1,01 | 0 | CC | A>C | | |
| 28550 | 89,66 | 42356860 | | 10 | G | 29 | 21 | 89,7 | 3,45 | 0 | 3,5 | 0 | 3,45 | AA | G>A | | |
| 28552 | 83,67 | 42356931 | | 10 | A | 49 | 20 | 14,3 | 2,04 | 0 | 84 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28553 | 80,72 | 42356950 | | 10 | G | 83 | 20 | 10,8 | 80,7 | 6,02 | 1,2 | 0 | 1,2 | CC | G>C | | |

| Homozigotluk | Frekans | Krom. Pozis. | Gen | Kr. | Ref. | Kapsama | Skor | A(%) | C(%) | G(%) | T(%) | Ins(%) | Del(%) | Genotip | Mut. | Aa Değişimi | SNP Yerleşim |
|--------------|---------|--------------|-----|-----|------|---------|------|------|------|------|------|--------|--------|---------|------|-------------|--------------|
| 28554 | 88,24 | 42356951 | | 10 | T | 85 | 19 | 0 | 88,2 | 1,18 | 11 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28559 | 86,36 | 42357275 | | 10 | T | 22 | 21 | 86,4 | 4,55 | 0 | 9,1 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28561 | 88,46 | 42357290 | | 10 | G | 104 | 24 | 88,5 | 1,92 | 7,69 | 1 | 0 | 0,96 | AA | G>A | | |
| 28566 | 87,5 | 42357432 | | 10 | G | 8 | 8 | 0 | 0 | 12,5 | 88 | 0 | 0 | TT | G>T | | |
| 28567 | 87,5 | 42357436 | | 10 | G | 8 | 8 | 0 | 0 | 12,5 | 88 | 0 | 0 | TT | G>T | | |
| 28569 | 83,33 | 42357662 | | 10 | T | 6 | 8 | 0 | 83,3 | 0 | 17 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28576 | 100 | 42357952 | | 10 | T | 5 | 3 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28577 | 100 | 42357953 | | 10 | T | 5 | 3 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28579 | 87,5 | 42357973 | | 10 | G | 24 | 20 | 87,5 | 4,17 | 4,17 | 4,2 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 28591 | 92,86 | 42358832 | | 10 | T | 14 | 19 | 7,14 | 92,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28599 | 94,74 | 42359276 | | 10 | A | 38 | 25 | 2,63 | 94,7 | 2,63 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 28610 | 91,67 | 42359636 | | 10 | T | 24 | 20 | 0 | 4,17 | 0 | 92 | 75 | 4,17 | insC | insC | | |
| 28614 | 87,5 | 42359808 | | 10 | C | 8 | 9 | 0 | 0 | 0 | 88 | 0 | 12,5 | TT | C>T | | |
| 28615 | 87,5 | 42359809 | | 10 | A | 8 | 9 | 0 | 0 | 0 | 88 | 0 | 12,5 | TT | A>T | | |
| 28616 | 100 | 42359812 | | 10 | T | 8 | 6 | 0 | 0 | 0 | 100 | 62,5 | 0 | insA | insA | | |
| 28625 | 84,3 | 42360095 | | 10 | G | 121 | 23 | 84,3 | 2,48 | 9,92 | 3,3 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 28626 | 98,35 | 42360101 | | 10 | C | 121 | 19 | 0 | 0,83 | 0 | 98 | 0 | 0,83 | TT | C>T | | |
| 28627 | 86,78 | 42360103 | | 10 | G | 121 | 17 | 0,83 | 86,8 | 12,4 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | | |
| 28628 | 86,4 | 42360109 | | 10 | C | 125 | 19 | 0,8 | 8,8 | 0 | 86 | 0 | 4 | TT | C>T | | |
| 28629 | 87,2 | 42360111 | | 10 | C | 125 | 18 | 1,6 | 7,2 | 0 | 87 | 1,6 | 4 | TT | C>T | | |
| 28630 | 88,28 | 42360113 | | 10 | G | 128 | 21 | 6,25 | 88,3 | 0,78 | 0,8 | 0,78 | 3,91 | CC | G>C | | |
| 28633 | 87,14 | 42360551 | | 10 | A | 70 | 22 | 5,71 | 87,1 | 4,29 | 2,9 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 28634 | 81,33 | 42360556 | | 10 | C | 75 | 23 | 0 | 14,7 | 81,3 | 4 | 0 | 0 | GG | C>G | | |
| 28654 | 100 | 42361300 | | 10 | A | 5 | 4 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 28655 | 100 | 42361304 | | 10 | G | 5 | 4 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | | |
| 28656 | 83,33 | 42361430 | | 10 | A | 12 | 14 | 8,33 | 83,3 | 8,33 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 28666 | 100 | 42361832 | | 10 | A | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28668 | 83,33 | 42362010 | | 10 | C | 6 | 4 | 0 | 16,7 | 0 | 83 | 0 | 0 | TT | C>T | | |
| 28669 | 87,5 | 42362012 | | 10 | G | 8 | 7 | 0 | 87,5 | 12,5 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | | |
| 28670 | 90 | 42362020 | | 10 | A | 10 | 11 | 0 | 10 | 0 | 90 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28671 | 85,71 | 42362099 | | 10 | C | 7 | 9 | 0 | 14,3 | 0 | 86 | 0 | 0 | TT | C>T | | |
| 28672 | 87,5 | 42362156 | | 10 | A | 8 | 10 | 12,5 | 87,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 28673 | 87,5 | 42362163 | | 10 | T | 8 | 9 | 87,5 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28689 | 88,89 | 42362676 | | 10 | A | 9 | 7 | 0 | 88,9 | 0 | 0 | 0 | 11,11 | CC | A>C | | |
| 28690 | 82,61 | 42362681 | | 10 | T | 23 | 16 | 0 | 82,6 | 0 | 17 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28694 | 93,75 | 42362693 | | 10 | A | 32 | 21 | 3,12 | 0 | 93,8 | 3,1 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 28702 | 93,85 | 42363367 | | 10 | A | 65 | 21 | 4,62 | 0 | 0 | 94 | 0 | 1,54 | TT | A>T | | |
| 28721 | 100 | 42364356 | | 10 | A | 5 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 60 | 0 | insC | insC | | |
| 28727 | 83,33 | 42364600 | | 10 | T | 6 | 5 | 83,3 | 0 | 0 | 17 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28729 | 92,93 | 42364681 | | 10 | G | 99 | 21 | 0 | 5,05 | 2,02 | 93 | 0 | 0 | TT | G>T | | |
| 28741 | 100 | 42364971 | | 10 | T | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 100 | 75 | 0 | insA | insA | | |
| 28752 | 85,71 | 42365117 | | 10 | G | 28 | 17 | 0 | 0 | 7,14 | 86 | 0 | 7,14 | TT | G>T | | |
| 28757 | 85,42 | 42365136 | | 10 | C | 48 | 21 | 2,08 | 12,5 | 0 | 85 | 0 | 0 | TT | C>T | | |
| 28760 | 81,97 | 42365154 | | 10 | C | 61 | 26 | 0 | 18 | 0 | 82 | 0 | 0 | TT | C>T | | |
| 28761 | 85,71 | 42365227 | | 10 | C | 14 | 17 | 0 | 14,3 | 0 | 86 | 0 | 0 | TT | C>T | | |
| 28766 | 86,67 | 42365435 | | 10 | G | 15 | 16 | 86,7 | 6,67 | 6,67 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 28767 | 100 | 42365473 | | 10 | C | 5 | 5 | 0 | 100 | 0 | 0 | 60 | 0 | insG | insG | | |
| 28773 | 81,82 | 42365921 | | 10 | C | 44 | 22 | 2,27 | 13,6 | 2,27 | 82 | 0 | 0 | TT | C>T | | |
| 28777 | 80,36 | 42365941 | | 10 | C | 112 | 23 | 80,4 | 12,5 | 0,89 | 1,8 | 0 | 4,46 | AA | C>A | | |
| 28787 | 88,89 | 42366454 | | 10 | T | 9 | 14 | 0 | 88,9 | 0 | 11 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28788 | 100 | 42366464 | | 10 | C | 4 | 11 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | | |
| 28793 | 100 | 42366653 | | 10 | T | 7 | 8 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28795 | 84 | 42366843 | | 10 | A | 25 | 20 | 16 | 84 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 28800 | 100 | 42367053 | | 10 | G | 18 | 20 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | | |
| 28807 | 92,86 | 42367676 | | 10 | G | 14 | 16 | 0 | 92,9 | 0 | 0 | 0 | 7,14 | CC | G>C | | |
| 28809 | 93,33 | 42367777 | | 10 | A | 15 | 17 | 0 | 93,3 | 6,67 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 28812 | 85,71 | 42367911 | | 10 | T | 7 | 13 | 14,3 | 85,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28816 | 96,43 | 42368110 | | 10 | A | 56 | 23 | 1,79 | 0 | 1,79 | 96 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28818 | 87,69 | 42368119 | | 10 | C | 65 | 19 | 1,54 | 6,15 | 0 | 88 | 0 | 4,62 | TT | C>T | | |
| 28819 | 100 | 42368182 | | 10 | T | 6 | 6 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28826 | 83,33 | 42368433 | | 10 | T | 6 | 7 | 0 | 83,3 | 0 | 17 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28827 | 100 | 42368442 | | 10 | T | 5 | 7 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28833 | 85,71 | 42369175 | | 10 | A | 7 | 6 | 14,3 | 85,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 28841 | 90 | 42369495 | | 10 | T | 10 | 11 | 10 | 90 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28847 | 88,89 | 42369579 | | 10 | G | 9 | 13 | 0 | 0 | 11,1 | 89 | 0 | 0 | TT | G>T | | |
| 28850 | 88,89 | 42369585 | | 10 | A | 9 | 7 | 11,1 | 88,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 28851 | 92,31 | 42369590 | | 10 | T | 13 | 12 | 0 | 92,3 | 0 | 7,7 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28854 | 86,67 | 42369601 | | 10 | T | 45 | 23 | 2,22 | 2,22 | 86,7 | 8,9 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 28855 | 85,27 | 42369655 | | 10 | C | 129 | 21 | 13,2 | 85,3 | 0,78 | 0,8 | 64,34 | 0 | insA | insA | | |
| 28858 | 81,89 | 42369661 | | 10 | T | 127 | 21 | 3,94 | 3,94 | 81,9 | 8,7 | 0 | 1,57 | GG | T>G | | |
| 28863 | 81,82 | 42369809 | | 10 | C | 11 | 11 | 0 | 18,2 | 0 | 82 | 0 | 0 | TT | C>T | | |
| 28865 | 100 | 42369879 | | 10 | G | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | | |
| 28866 | 85,71 | 42370088 | | 10 | A | 7 | 9 | 14,3 | 0 | 85,7 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 28867 | 85,71 | 42370093 | | 10 | C | 7 | 5 | 0 | 14,3 | 0 | 86 | 0 | 0 | TT | C>T | | |
| 28869 | 100 | 42370107 | | 10 | C | 9 | 11 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | | |
| 28878 | 100 | 42370745 | | 10 | A | 4 | 12 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 28884 | 100 | 42371831 | | 10 | T | 5 | 12 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28890 | 87,5 | 42372702 | | 10 | A | 8 | 15 | 12,5 | 87,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 28892 | 100 | 42372763 | | 10 | T | 7 | 14 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | | |

| Homozigotluk | Frekans | Krom. Pozis. | Gen | Kr. | Ref. | Kapsama | Skor | A(%) | C(%) | G(%) | T(%) | Ins(%) | Del(%) | Genotip | Mut. | Aa Değişimi | SNP Yerleşim |
|--------------|---------|--------------|-----|-----|------|---------|------|------|------|------|------|--------|--------|---------|--------|-------------|--------------|
| 28896 | 81,25 | 42372844 | | 10 | G | 16 | 15 | 0 | 6,25 | 12,5 | 81 | 0 | 0 | TT | G>T | | |
| 28899 | 100 | 42373059 | | 10 | C | 7 | 17 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | | |
| 28900 | 100 | 42373064 | | 10 | T | 9 | 12 | 0 | 0 | 0 | 100 | 77,78 | 0 | insG | insG | | |
| 28901 | 84,62 | 42373425 | | 10 | A | 13 | 12 | 0 | 84,6 | 7,69 | 7,7 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 28902 | 87,5 | 42373427 | | 10 | T | 16 | 15 | 87,5 | 6,25 | 0 | 6,3 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28904 | 90,48 | 42373432 | | 10 | C | 21 | 18 | 90,5 | 9,52 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | | |
| 28913 | 80,95 | 42374211 | | 10 | T | 42 | 24 | 2,38 | 81 | 7,14 | 9,5 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28915 | 80,56 | 42374270 | | 10 | G | 36 | 24 | 0 | 80,6 | 16,7 | 2,8 | 0 | 0 | CC | G>C | | |
| 28917 | 81,82 | 42374506 | | 10 | T | 11 | 16 | 81,8 | 0 | 0 | 18 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28920 | 88,89 | 42374591 | | 10 | C | 9 | 8 | 0 | 11,1 | 0 | 89 | 0 | 0 | TT | C>T | | |
| 28931 | 89,77 | 42374780 | | 10 | T | 88 | 20 | 89,8 | 0 | 2,27 | 8 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28935 | 86,46 | 42374801 | | 10 | C | 96 | 19 | 86,5 | 7,29 | 3,12 | 2,1 | 0 | 1,04 | AA | C>A | | |
| 28936 | 100 | 42375015 | | 10 | T | 13 | 21 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28937 | 91,67 | 42375020 | | 10 | C | 12 | 20 | 91,7 | 8,33 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | | |
| 28939 | 100 | 42375033 | | 10 | G | 6 | 16 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | | |
| 28940 | 100 | 42375039 | | 10 | T | 4 | 12 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 28960 | 100 | 42377347 | | 10 | T | 4 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 28982 | 84,12 | 42378579 | | 10 | G | 170 | 24 | 1,76 | 84,1 | 10,6 | 3,5 | 0 | 0 | CC | G>C | | |
| 28983 | 80,22 | 42378587 | | 10 | C | 182 | 26 | 80,2 | 13,7 | 2,75 | 2,8 | 1,1 | 0,55 | AA | C>A | | |
| 28988 | 100 | 42379069 | | 10 | T | 4 | 12 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 28994 | 85,71 | 42379320 | | 10 | C | 7 | 6 | 85,7 | 0 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | | |
| 28996 | 100 | 42379687 | | 10 | C | 4 | 12 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | | |
| 28999 | 100 | 42379778 | | 10 | T | 5 | 4 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 29001 | 90 | 42379865 | | 10 | T | 20 | 14 | 10 | 0 | 90 | 0 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 29002 | 88,24 | 42379867 | | 10 | T | 34 | 17 | 88,2 | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 29003 | 88,57 | 42379869 | | 10 | T | 35 | 16 | 0 | 8,57 | 88,6 | 2,9 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 29004 | 90,24 | 42379873 | | 10 | T | 41 | 14 | 0 | 90,2 | 2,44 | 7,3 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 29005 | 88,24 | 42379879 | | 10 | T | 51 | 18 | 3,92 | 88,2 | 3,92 | 3,9 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 29007 | 89 | 42379906 | | 10 | T | 100 | 23 | 1 | 89 | 0 | 10 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 29009 | 91,18 | 42379954 | | 10 | G | 34 | 18 | 2,94 | 91,2 | 0 | 5,9 | 0 | 0 | CC | G>C | | |
| 29030 | 100 | 42380791 | | 10 | T | 5 | 8 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 29034 | 80,6 | 42380865 | | 10 | G | 67 | 20 | 80,6 | 1,49 | 16,4 | 1,5 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 29036 | 90 | 42380969 | | 10 | T | 10 | 13 | 0 | 90 | 0 | 10 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 29054 | 85,71 | 42382177 | | 10 | A | 7 | 8 | 14,3 | 0 | 0 | 86 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 29055 | 85,71 | 42382178 | | 10 | A | 7 | 8 | 14,3 | 85,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 29067 | 100 | 42382642 | | 10 | G | 7 | 17 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | | |
| 29068 | 85,71 | 42382658 | | 10 | T | 7 | 14 | 85,7 | 0 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 29069 | 85,71 | 42382662 | | 10 | T | 7 | 14 | 0 | 85,7 | 0 | 14 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 29104 | 87,31 | 42384681 | | 10 | A | 134 | 24 | 2,24 | 2,24 | 87,3 | 0,8 | 0 | 7,46 | GG | A>G | | |
| 29197 | 80,65 | 42390677 | | 10 | T | 31 | 25 | 16,1 | 0 | 80,7 | 3,2 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 29198 | 84,03 | 42390732 | | 10 | T | 263 | 25 | 0 | 0 | 84 | 16 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 29202 | 81,34 | 42391006 | | 10 | T | 134 | 24 | 1,49 | 81,3 | 1,49 | 16 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 29251 | 89,66 | 42393915 | | 10 | T | 29 | 20 | 89,7 | 0 | 6,9 | 3,5 | 3,45 | 0 | AA | T>A | | |
| 29253 | 88,46 | 42393918 | | 10 | A | 26 | 20 | 7,69 | 0 | 88,5 | 0 | 0 | 3,85 | GG | A>G | | |
| 29256 | 88,89 | 42393963 | | 10 | A | 9 | 10 | 11,1 | 0 | 0 | 89 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 29306 | 100 | 42397858 | | 10 | G | 6 | 8 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | | |
| 29307 | 100 | 42397859 | | 10 | A | 6 | 8 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 29310 | 100 | 42397917 | | 10 | T | 7 | 11 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 29336 | 81,25 | 42399987 | | 10 | G | 16 | 20 | 81,3 | 12,5 | 6,25 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 29352 | 90 | 42408283 | | 10 | G | 20 | 23 | 90 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 29355 | 100 | 42409332 | | 10 | A | 4 | 7 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 29368 | 100 | 42527541 | | 10 | A | 4 | 6 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 29390 | 85,71 | 42529990 | | 10 | A | 7 | 9 | 14,3 | 85,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 29392 | 100 | 42530061 | | 10 | A | 4 | 7 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 29396 | 87,5 | 42530276 | | 10 | T | 8 | 16 | 87,5 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | AA | T>A | | |
| 29397 | 85,71 | 42530280 | | 10 | A | 7 | 13 | 14,3 | 0 | 0 | 86 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 29400 | 100 | 42530614 | | 10 | C | 10 | 19 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | | |
| 29415 | 87,5 | 42531894 | | 10 | A | 24 | 22 | 12,5 | 0 | 87,5 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 29416 | 91,3 | 42531897 | | 10 | T | 23 | 22 | 0 | 91,3 | 8,7 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 29419 | 83,33 | 42531920 | | 10 | T | 18 | 24 | 0 | 0 | 83,3 | 17 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 29476 | 100 | 42535548 | | 10 | G | 15 | 14 | 0 | 0 | 100 | 0 | 66,67 | 0 | insT | insT | | |
| 29478 | 100 | 42536150 | | 10 | A | 6 | 3 | 100 | 0 | 0 | 0 | 66,67 | 0 | insTG | insTG | | |
| 29497 | 90,91 | 42539359 | | 10 | C | 11 | 21 | 90,9 | 9,09 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | | |
| 29502 | 87,5 | 42543277 | | 10 | T | 8 | 15 | 0 | 87,5 | 0 | 13 | 0 | 0 | CC | T>C | | |
| 29503 | 100 | 42543292 | | 10 | C | 14 | 22 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | | |
| 29509 | 100 | 42543359 | | 10 | G | 15 | 17 | 0 | 0 | 100 | 0 | 73,33 | 0 | insT | insT | | |
| 29512 | 100 | 42596684 | | 10 | G | 16 | 14 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | | |
| 29513 | 100 | 42596687 | | 10 | G | 16 | 13 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | | |
| 29514 | 100 | 42596694 | | 10 | A | 16 | 12 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | | |
| 29515 | 100 | 42596695 | | 10 | A | 16 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | delAAG | delAAG | | |
| 29518 | 88,89 | 42596703 | | 10 | A | 18 | 11 | 11,1 | 88,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 29521 | 100 | 42596792 | | 10 | A | 15 | 17 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 29550 | 83,33 | 42599065 | | 10 | T | 6 | 4 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 83,33 | delIT | delIT | | |
| 29551 | 83,33 | 42599067 | | 10 | T | 6 | 4 | 0 | 0 | 83,3 | 17 | 0 | 0 | GG | T>G | | |
| 29552 | 83,33 | 42599068 | | 10 | C | 6 | 4 | 83,3 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | | |
| 29553 | 85,71 | 42599072 | | 10 | A | 7 | 5 | 14,3 | 85,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 29554 | 84,97 | 42599160 | | 10 | A | 193 | 26 | 13,5 | 0,52 | 85 | 1 | 0 | 0 | GG | A>G | | |
| 29558 | 100 | 42599239 | | 10 | A | 5 | 10 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | | |
| 29561 | 80,95 | 42599268 | | 10 | C | 21 | 17 | 0 | 4,76 | 4,76 | 9,5 | 0 | 80,95 | delICG | delICG | | |

| Homozigotluk | Frekans | Krom. Pozis. | Gen | Kr. | Ref. | Kapsama | Skor | A(%) | C(%) | G(%) | T(%) | Ins(%) | Del(%) | Genotip | Mut. Aa Değişimi | SNP Yerleşim |
|--------------|---------|--------------|-----------|-----|------|---------|------|------|------|------|------|--------|--------|---------|------------------|---------------|
| 29572 | 85,71 | 42599551 | | 10 | C | 7 | 9 | 0 | 0 | 85,7 | 0 | 0 | 14,29 | GG | C>G | |
| 29574 | 94,79 | 42599603 | | 10 | A | 365 | 27 | 4,93 | 0,27 | 94,8 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 29589 | 100 | 42661517 | | 10 | C | 4 | 7 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 29590 | 100 | 42664293 | | 10 | T | 4 | 10 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 29592 | 100 | 42664297 | | 10 | T | 4 | 10 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | |
| 29593 | 100 | 42664301 | | 10 | T | 4 | 10 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | T>G | |
| 29594 | 100 | 42664349 | | 10 | T | 4 | 12 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 29595 | 100 | 42664350 | | 10 | A | 4 | 12 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 29618 | 100 | 42808181 | | 10 | G | 5 | 12 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | |
| 29619 | 87,5 | 42808239 | | 10 | G | 8 | 16 | 0 | 87,5 | 12,5 | 0 | 12,5 | 0 | CC | G>C | |
| 29622 | 100 | 42808253 | | 10 | T | 5 | 11 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 29627 | 91,67 | 42815365 | | 10 | C | 12 | 12 | 0 | 0 | 8,33 | 92 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 29633 | 85,71 | 42815423 | | 10 | G | 42 | 16 | 0 | 85,7 | 9,52 | 0 | 0 | 4,76 | CC | G>C | |
| 29634 | 80,49 | 42815425 | | 10 | G | 41 | 16 | 0 | 4,88 | 9,76 | 80 | 0 | 4,88 | TT | G>T | |
| 29635 | 92,31 | 42815432 | | 10 | G | 39 | 17 | 2,56 | 92,3 | 5,13 | 0 | 0 | 0 | CC | G>C | |
| 29636 | 92,31 | 42815434 | | 10 | T | 39 | 17 | 92,3 | 0 | 0 | 7,7 | 0 | 0 | AA | T>A | |
| 29637 | 84,38 | 42815443 | | 10 | T | 32 | 20 | 6,25 | 84,4 | 3,12 | 6,3 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 29643 | 87,5 | 42817376 | | 10 | A | 8 | 10 | 12,5 | 0 | 87,5 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 29649 | 100 | 43046243 | ZNF37B | 10 | T | 4 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | |
| 29650 | 100 | 43046282 | ZNF37B | 10 | A | 4 | 2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 29671 | 100 | 43682088 | HNRNPF | 10 | G | 6 | 13 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A415D>D | |
| 29689 | 100 | 46898858 | FAM35B | 10 | T | 4 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | delT | delT | |
| 29697 | 100 | 47058952 | | 10 | A | 5 | 4 | 100 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | insCA | insCA | |
| 29699 | 85,71 | 47059421 | | 10 | C | 7 | 5 | 0 | 14,3 | 0 | 86 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 29776 | 100 | 50873340 | | 10 | A | 9 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 55,56 | 0 | insC | insC | |
| 29787 | 100 | 50950467 | OGDHL | 10 | T | 5 | 7 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | T>A | |
| Son | 100 | 52083060 | rs2842096 | 10 | | | | | | | | | 100 | | | SNP_A-1829234 |
| Başlangıç | 100 | 88407055 | rs2803546 | 10 | | | | | | | | | 100 | | | SNP_A-2209474 |
| 30368 | 93,33 | 90342024 | RNLS | 10 | C | 15 | 25 | 6,67 | 0 | 0 | 93 | 0 | 0 | TT | C>T 53Q>Q | |
| 30393 | 83,33 | 91152228 | | 10 | A | 6 | 5 | 16,7 | 83,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | |
| 30410 | 100 | 92502860 | HTR7 | 10 | C | 5 | 8 | 0 | 100 | 0 | 0 | 80 | 0 | insA | insA | |
| Son | 100 | 93301428 | rs1224654 | 10 | | | | | | | | | 100 | | | SNP_A-2184858 |
| Başlangıç | 100 | 73128140 | rs2240344 | 14 | | | | | | | | | 100 | | | SNP_A-2174145 |
| 38661 | 100 | 73406521 | WDR21A | 14 | G | 8 | 14 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A 35R>Q | |
| 38682 | 85,71 | 73719616 | LOC10028 | 14 | T | 7 | 6 | 0 | 0 | 85,7 | 14 | 0 | 0 | GG | T>G | |
| 38685 | 100 | 73727979 | PAPLN | 14 | G | 7 | 17 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A 714G>D | |
| 38771 | 100 | 74989812 | LTBP2 | 14 | C | 7 | 11 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 38781 | 100 | 75201644 | FCF1 | 14 | A | 15 | 23 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | |
| 38782 | 100 | 75349255 | DLST | 14 | C | 5 | 2 | 0 | 100 | 0 | 0 | 60 | 0 | insT | insT | |
| 38820 | 100 | 75588057 | NEK9 | 14 | A | 5 | 4 | 100 | 0 | 0 | 0 | 60 | 0 | insC | insC | |
| 38864 | 100 | 77687755 | TMEM63C | 14 | C | 6 | 9 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 38868 | 100 | 77797046 | GSTZ1 | 14 | G | 10 | 18 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | |
| 38880 | 100 | 77909019 | C14orf133 | 14 | A | 11 | 23 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 38890 | 100 | 77944294 | ISM2 | 14 | C | 7 | 14 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 38914 | 100 | 78391222 | ADCK1 | 14 | A | 5 | 8 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 38919 | 100 | 79933278 | NRXN3 | 14 | C | 6 | 9 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 38938 | 100 | 81743539 | STON2 | 14 | A | 12 | 23 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T 706W>R | |
| 38971 | 100 | 89827402 | FOXN3 | 14 | T | 12 | 15 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 38973 | 90 | 89827567 | FOXN3 | 14 | C | 10 | 10 | 0 | 10 | 0 | 90 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 38975 | 92,31 | 89827969 | FOXN3 | 14 | C | 13 | 14 | 0 | 7,69 | 92,3 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 38976 | 85,71 | 89828782 | FOXN3 | 14 | C | 7 | 3 | 0 | 85,7 | 0 | 14 | 57,14 | 0 | insA | insA | |
| 38977 | 83,33 | 89828842 | FOXN3 | 14 | T | 6 | 5 | 0 | 83,3 | 0 | 17 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 38978 | 83,33 | 89828844 | FOXN3 | 14 | T | 6 | 5 | 83,3 | 0 | 0 | 17 | 0 | 0 | AA | T>A | |
| 39016 | 100 | 91701012 | GPR68 | 14 | C | 7 | 8 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T 138R>H | |
| 39030 | 85,71 | 91759932 | CCDC88C | 14 | G | 7 | 5 | 85,7 | 0 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 39087 | 100 | 93118229 | RIN3 | 14 | C | 6 | 13 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T 279R>C | |
| 39143 | 100 | 94253884 | PRIMA1 | 14 | G | 5 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | delG | delG | |
| 39156 | 100 | 94563439 | IFI27L1 | 14 | A | 10 | 14 | 100 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | insG | insG | |
| 39200 | 100 | 95356771 | | 14 | G | 6 | 6 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 39206 | 100 | 95864155 | | 14 | T | 5 | 4 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | insG | insG | |
| Son | 100 | 96579435 | rs1953254 | 14 | | | | | | | | | 100 | | | SNP_A-1934838 |
| Başlangıç | 100 | 32177459 | rs317401 | 17 | | | | | | | | | 100 | | | SNP_A-2151776 |
| 45022 | 100 | 32689866 | CCL1 | 17 | G | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | |
| 45024 | 100 | 32689874 | CCL1 | 17 | A | 6 | 3 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | |
| 45025 | 83,33 | 32689875 | CCL1 | 17 | G | 6 | 2 | 0 | 16,7 | 0 | 83 | 0 | 0 | TT | G>T | |
| 45026 | 100 | 32689876 | CCL1 | 17 | A | 6 | 4 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | |
| 45027 | 100 | 32689878 | CCL1 | 17 | C | 6 | 4 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 45028 | 100 | 32689879 | CCL1 | 17 | C | 8 | 6 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 45157 | 100 | 35931054 | AP1GBP1 | 17 | G | 6 | 6 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 45166 | 100 | 36289670 | TBC1D3F | 17 | G | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | |
| 45184 | 85,71 | 36927692 | PIP4K2B | 17 | C | 7 | 5 | 14,3 | 85,7 | 0 | 0 | 71,43 | 0 | insAAG | insAAGT | |
| 45197 | 100 | 37008621 | RPL23 | 17 | T | 7 | 3 | 0 | 0 | 0 | 100 | 57,14 | 0 | insC | insC | |
| 45254 | 100 | 37947427 | IKZF3 | 17 | A | 4 | 2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 45304 | 100 | 38183509 | MED24 | 17 | C | 8 | 17 | 0 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 | insG | insG | |
| 45312 | 83,33 | 38251386 | NR1D1 | 17 | A | 18 | 20 | 83,3 | 0 | 0 | 17 | 72,22 | 0 | insT | insT | |
| 45316 | 100 | 38300746 | CASC3 | 17 | C | 8 | 10 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 45317 | 100 | 38300751 | CASC3 | 17 | C | 9 | 10 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 45318 | 100 | 38300752 | CASC3 | 17 | C | 9 | 10 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 45319 | 88,89 | 38300759 | CASC3 | 17 | A | 9 | 10 | 0 | 0 | 88,9 | 11 | 0 | 0 | GG | A>G | |

| Homozigotluk | Frekans | Krom. Pozis. | Gen | Kr. | Ref. | Kapsama | Skor | A(%) | C(%) | G(%) | T(%) | Ins(%) | Del(%) | Genotip | Mut. Aa Değişimi | SNP Yerleşim |
|--------------|---------|--------------|-----------|-----|------|---------|------|------|------|------|------|--------|--------|---------|------------------|---------------|
| 45323 | 100 | 38300810 | CASC3 | 17 | C | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 45324 | 100 | 38300816 | CASC3 | 17 | A | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | A>T | |
| 45325 | 100 | 38300817 | CASC3 | 17 | T | 4 | 2 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 45360 | 100 | 39164857 | KRTAP3-1 | 17 | G | 7 | 14 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 45362 | 100 | 39164919 | KRTAP3-1 | 17 | C | 13 | 25 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 45363 | 100 | 39165174 | KRTAP3-1 | 17 | G | 40 | 25 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A 51C>C | |
| 45364 | 91,67 | 39165364 | KRTAP3-1 | 17 | T | 12 | 15 | 8,33 | 0 | 0 | 92 | 66,67 | 0 | insAAG | insAAG | |
| 45366 | 100 | 39254337 | | 17 | G | 7 | 13 | 0 | 0 | 100 | 0 | 85,71 | 0 | insT | insT | |
| 45386 | 100 | 39427563 | KRTAP9P | 17 | A | 4 | 7 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 45427 | 100 | 39657609 | KRT13 | 17 | C | 16 | 28 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T 426V>I | |
| 45506 | 100 | 40377168 | STAT5B | 17 | G | 6 | 13 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 45507 | 81,25 | 40447820 | STAT5A | 17 | C | 32 | 20 | 0 | 18,8 | 0 | 81 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 45528 | 85,11 | 40812799 | TUBG2 | 17 | G | 47 | 23 | 0 | 2,13 | 85,1 | 13 | 76,6 | 0 | insT | insT | |
| 45577 | 92,31 | 41165632 | IFI35 | 17 | G | 13 | 21 | 92,3 | 0 | 7,69 | 0 | 7,69 | 0 | AA | G>A 174R>Q | |
| 45621 | 100 | 41932259 | CD300LG | 17 | A | 5 | 4 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | |
| 45641 | 100 | 42143664 | LSM12 | 17 | C | 5 | 8 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 45651 | 83,33 | 42171411 | HDAC5 | 17 | G | 6 | 13 | 83,3 | 0 | 16,7 | 0 | 16,67 | 0 | AA | G>A | |
| 45658 | 100 | 42330903 | SLC4A1 | 17 | A | 4 | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 75 | 0 | insG | insG | |
| 45662 | 100 | 42338692 | SLC4A1 | 17 | G | 9 | 18 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | |
| 45739 | 86,67 | 43062436 | | 17 | T | 15 | 14 | 86,7 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | AA | T>A | |
| 45752 | 93,75 | 43311704 | FMNL1 | 17 | A | 16 | 16 | 6,25 | 93,8 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | |
| 45771 | 100 | 44144993 | KIAA1267 | 17 | C | 13 | 20 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G 525R>P | |
| 45850 | 100 | 46152719 | CBX1 | 17 | C | 5 | 2 | 0 | 100 | 0 | 0 | 60 | 0 | insG | insG | |
| 45854 | 83,33 | 46189246 | SNX11 | 17 | G | 6 | 4 | 0 | 16,7 | 83,3 | 0 | 66,67 | 0 | insT | insT | |
| 45905 | 100 | 47793703 | FAM117A | 17 | A | 18 | 25 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | |
| 46056 | 100 | 51900140 | | 17 | A | 10 | 16 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 46061 | 100 | 51902048 | KIF2B | 17 | C | 21 | 23 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T 552R>C | |
| 46079 | 100 | 53393145 | HLF | 17 | G | 5 | 4 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 46088 | 100 | 54403792 | ANKFN1 | 17 | A | 11 | 23 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| Son | 100 | 55847966 | rs1694237 | 17 | | | | | | | | | | | | SNP_A-1864466 |
| Başlangıç | 100 | 10920018 | rs303304 | 21 | | | | | | | | | 100 | | | SNP_A-2015094 |
| 53348 | 100 | 11186768 | | 21 | C | 7 | 14 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 53349 | 100 | 11186811 | | 21 | C | 8 | 14 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 53351 | 83,33 | 11186826 | | 21 | A | 6 | 5 | 16,7 | 0 | 83,3 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 53352 | 85,71 | 14343580 | | 21 | G | 7 | 14 | 0 | 0 | 14,3 | 86 | 0 | 0 | TT | G>T | |
| 53354 | 83,33 | 14343598 | | 21 | A | 18 | 14 | 16,7 | 83,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | |
| 53355 | 83,33 | 14343599 | | 21 | A | 18 | 14 | 16,7 | 0 | 83,3 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 53356 | 83,33 | 14343601 | | 21 | A | 18 | 14 | 16,7 | 0 | 83,3 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 53357 | 83,33 | 14343604 | | 21 | G | 18 | 14 | 0 | 0 | 16,7 | 83 | 0 | 0 | TT | G>T | |
| 53358 | 82,35 | 14343641 | | 21 | A | 17 | 19 | 17,7 | 82,4 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | |
| 53359 | 93,75 | 14343644 | | 21 | T | 16 | 22 | 0 | 0 | 93,8 | 6,3 | 0 | 0 | GG | T>G | |
| 53360 | 100 | 14343654 | | 21 | G | 12 | 19 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | |
| 53362 | 100 | 14343667 | | 21 | C | 4 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | delC | delC | |
| 53363 | 85,71 | 14353276 | | 21 | A | 7 | 10 | 14,3 | 0 | 85,7 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 53364 | 85,71 | 14353280 | | 21 | C | 7 | 10 | 85,7 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | C>A | |
| 53365 | 85,71 | 14353281 | | 21 | T | 7 | 10 | 85,7 | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 | AA | T>A | |
| 53367 | 88,89 | 14353286 | | 21 | C | 9 | 10 | 11,1 | 0 | 88,9 | 0 | 0 | 0 | GG | C>G | |
| 53368 | 100 | 14353290 | | 21 | A | 14 | 7 | 100 | 0 | 0 | 0 | 57,14 | 0 | insGCA | insGCA | |
| 53369 | 86,67 | 14353347 | | 21 | T | 15 | 25 | 0 | 86,7 | 0 | 13 | 6,67 | 0 | CC | T>C | |
| 53370 | 90,91 | 14353356 | | 21 | T | 11 | 14 | 0 | 90,9 | 0 | 9,1 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 53371 | 88,89 | 14353358 | | 21 | T | 9 | 11 | 0 | 0 | 88,9 | 11 | 0 | 0 | GG | T>G | |
| 53374 | 100 | 14889489 | | 21 | A | 6 | 6 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | GG | A>G | |
| 53391 | 100 | 16340786 | NRIP1 | 21 | A | 5 | 5 | 100 | 0 | 0 | 0 | 60 | 0 | insC | insC | |
| Son | 100 | 19928138 | rs1617486 | 21 | | | | | | | | | 100 | | | SNP_A-4270208 |
| Başlangıç | 100 | 36702300 | rs1009150 | 22 | | | | | | | | | 100 | | | SNP_A-2236421 |
| 54819 | 100 | 36919894 | EIF3D | 22 | C | 13 | 25 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 54881 | 100 | 37533823 | IL2RB | 22 | C | 8 | 9 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 54918 | 100 | 37964905 | CDC42EP | 22 | G | 5 | 12 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 54940 | 100 | 38041227 | SH3BP1 | 22 | C | 20 | 23 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T | |
| 55025 | 100 | 39113030 | GTPBP1 | 22 | G | 16 | 23 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 55027 | 100 | 39113290 | GTPBP1 | 22 | T | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 100 | 60 | 0 | insCCA | (insCCAGAA | |
| 55033 | 88,89 | 39224215 | NPTXR | 22 | G | 9 | 10 | 0 | 0 | 11,1 | 0 | 11,1 | 88,89 | delG | delG | |
| 55071 | 100 | 40356068 | GRAP2 | 22 | C | 34 | 26 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | C>T 60H>H | |
| 55096 | 96 | 41359960 | RBX1 | 22 | T | 25 | 25 | 0 | 0 | 96 | 4 | 0 | 0 | GG | T>G | |
| 55099 | 100 | 41526279 | EP300 | 22 | G | 4 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 55241 | 100 | 43603323 | SCUBE1 | 22 | A | 4 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | delAAC | delAACA | |
| 55261 | 100 | 43616398 | SCUBE1 | 22 | A | 4 | 7 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | A>C | |
| 55268 | 100 | 43887360 | MPPED1 | 22 | G | 4 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AA | G>A | |
| 55269 | 84,21 | 43891369 | MPPED1 | 22 | A | 19 | 17 | 10,5 | 0 | 0 | 84 | 0 | 5,26 | TT | A>T | |
| 55274 | 100 | 43892412 | MPPED1 | 22 | G | 14 | 17 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | TT | G>T | |
| 55278 | 93,75 | 43893034 | MPPED1 | 22 | T | 16 | 16 | 6,25 | 93,8 | 0 | 0 | 0 | 0 | CC | T>C | |
| 55356 | 83,33 | 45280455 | PHF21B | 22 | T | 6 | 5 | 0 | 16,7 | 0 | 83 | 83,33 | 0 | insCCA | insCCA | |
| Son | 100 | 45304108 | rs6006905 | 22 | | | | | | | | | 100 | | | SNP_A-4279733 |



Şekil 4.3. *CLC* yazılımında *CUBN* 53'üncü eksonunda bir baz çifti uzunluğundaki homozigot delesyonun görünümü (c.8355 delA).

III) Bulunan varyasyonun mutasyon olduğunun doğrulanması için A2410-22 bireyi DNA dizi analizi ile *CUBN* mutasyonu yönünden incelenmiş ve *CUBN* (c.8355delA) homozigot delesyonuna sahip olduğu gösterilmiştir. *CUBN* DNA dizi analizi için kullanılan primerler Tablo 4.5'te verilmiştir. Hastalıktan etkilenen diğer kardeşin (A2410-21) ve ebeveynlerinin (A2410-11 ve A2410 -12) DNA örnekleri dizi analizine alınmış ve bulunan *CUBN* (c.8355delA; p.S2785fsX19) mutasyonun hastalıktan etkilenen diğer kardeşte de (A2410-21) homozigot; ebeveynlerinde ise heterozigot olarak varlığı gösterilmiştir (Şekil 4.4). Mutasyonun varyasyon olma ihtimali veri bankası ile test edilmiş ve kontrol bireylerde olmadığı *1000 genome project* veri bankasıyla karşılaştırılarak görülmüştür. Ayrıca etnik olarak eş 92 sağlıklı kontrol bireyin ilgili mutasyon için DNA dizi analizi ile incelenmesi sonucu da mutasyon sağlıklı bireylerde bulunmamıştır.

Tablo 4.5. *CUBN*'in çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri.

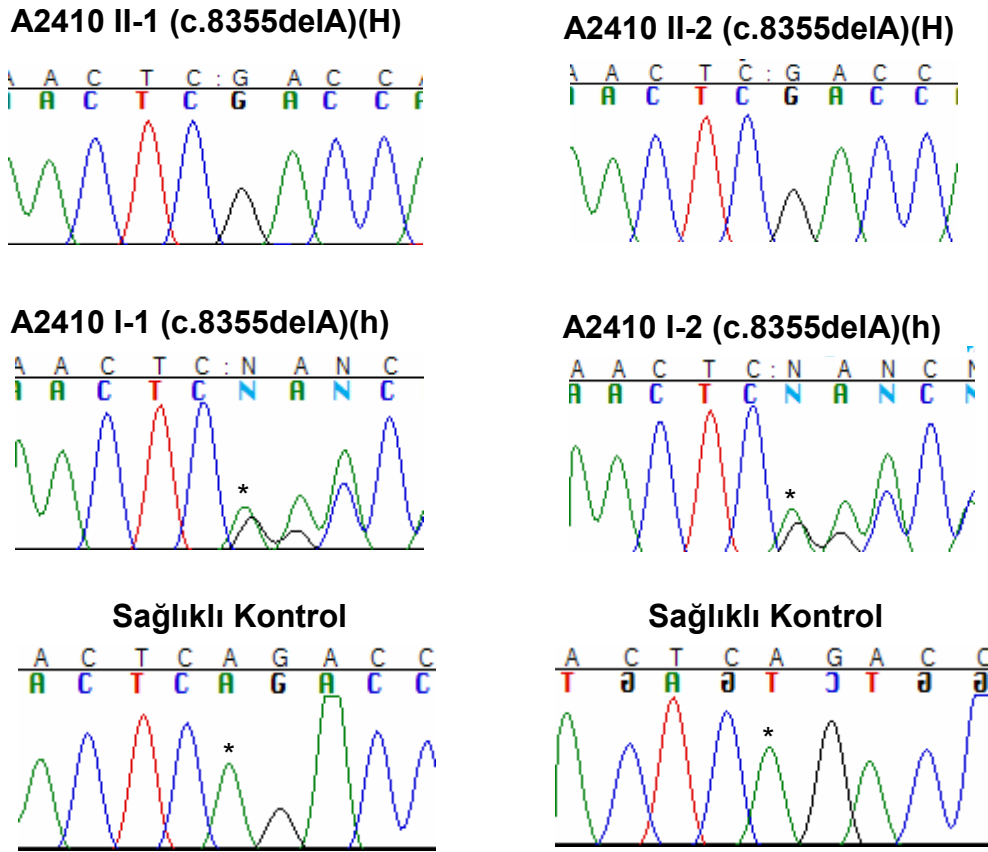
| Ekson numarası | Primer | Ayrışma derecesi (T _m °C) | Ampilikon Uzunluğu (bp) |
|----------------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Ekson 1 | 5'-GTTCTCCAAAATCCCATGCTC-3' | 60.01 | 258 |
| | 3'-GCTATTTGGGAAAACCTGGTGAG-5' | 59.93 | |
| Ekson 2 | 5'-GGACTAGGCTAATTCCTCACCAG-3' | 60.40 | 642 |
| | 3'-AGGGAGGCTGAAGACAGGTTG-5' | 62.14 | |
| Ekson 3 | 5'-GGCAAGATCTTAGTGCTTAAAGTAG-3' | 57.28 | 297 |
| | 3'-TGGTATATCCCCTACAAAACGG-5' | 59.96 | |
| Ekson 4 | 5'-GCAGAGGGCATTAGGACAATATG-3' | 59.43 | 235 |
| | 3'-TCATCCATTACCTTCAAATAAG-5' | 59.39 | |
| Ekson 5 | 5'-GTAACATGCGTTTTGTTGCTG-3' | 60.03 | 232 |
| | 3'-AATATGCCTGATGATTCCAAGG-5' | 58.54 | |
| Ekson 6 | 5'-ACGTATCATGTGAATGTTTCGCTC-3' | 60.26 | 235 |
| | 3'-ACTATGGGATGTTTTAGGCCTTC-5' | 57.99 | |
| Ekson 7 | 5'-TTGATATTAAGAGACAGGCACTGG-3' | 59.69 | 259 |
| | 3'-AGGAGGAGGAGGAGCTACTAACC-5' | 59.75 | |
| Ekson 8 | 5'-GAAATGTTCAAAGGCTTTTCTTG-3' | 58.29 | 297 |
| | 3'-GAAAGAAAATTGGTTCTGGCAC-5' | 59.19 | |
| Ekson 9 | 5'-TTTTATAGTTCCTTAGGTGGAGAAGG-3' | 59.53 | 353 |
| | 3'-TATTCCTATGTCTGTGTTCCCTG-5' | 60.35 | |
| Ekson 10 | 5'-AATCCTAGACAGGCTTTGTCTC-3' | 59.28 | 228 |
| | 3'-GATGTTGAATTGGTTTAGAAGGTC-5' | 58.14 | |
| Ekson 11 | 5'-GGATGTTGGTGGATCCTTGTC-3' | 59.51 | 270 |
| | 3'-TCTTGACATTCCTGAATCCTATAAC-5' | 57.83 | |
| Ekson 12 | 5'-CATGGCACTACATTCCTATTATTTG-3' | 58.93 | 368 |
| | 3'-TCTGTTGAGGGACTCACTAAAGG-5' | 59.66 | |
| Ekson 13 | 5'-GTTTATCAGCAGCAGGGTTACAG-3' | 60.42 | 394 |
| | 3'-GTCTAGCCAAAATAATGGCACTC-5' | 59.05 | |
| Ekson 14 | 5'-TGCCTAGGAAGTGGGAGAAATAC-3' | 60.23 | 493 |
| | 3'-GGGCAACAGAGTAAGACCTTGTC-5' | 58.85 | |
| Ekson 15 | 5'-AAACAAAGTTTGGCTTCTTACGC-3' | 62.05 | 319 |
| | 3'-CAGCTAATATTTTGGGGTCATCC-5' | 59.54 | |
| Ekson 16 | 5'-ATTTGGATGTGATGGGGAAC-3' | 57.19 | 341 |
| | 3'-CAGTCAGTCATCCTCTGAATCAC-5' | 58.02 | |
| Ekson 17 | 5'-GGGTGAATAAAATGGATATGTGC-3' | 59.22 | 323 |
| | 3'-TCTTTTGAAGACCACCTCTG-5' | 58.85 | |
| Ekson 18 | 5'-CAGCATTTTCATGTTATTGCATTG-3' | 60.50 | 315 |
| | 3'-CAGTTAATTCATCCCCGCAAG-5' | 58.09 | |
| Ekson 19 | 5'-TCTCCTCAGGCAGTATTAGATTTG-3' | 58.21 | 357 |
| | 3'-AACAGATTTGAAGACAACAACCC-5' | 59.42 | |
| Ekson 20 | 5'-CTGTGGTTTCAGGGGAATGAG-3' | 60.82 | 573 |
| | 3'-CTTAGTTGCCACTTAAGATAACCTG-5' | 57.81 | |
| Ekson 21 | 5'-CCTTTTAATTTGAAATCCAGGTAG-3' | 57.50 | 340 |
| | 3'-TGAAGCAGGAAATCAGTGAAG-5' | 58.09 | |
| Ekson 22 | 5'-TTGTGTTTTAAGGTTGATGAGAGG-3' | 59.58 | 370 |
| | 3'-GCTATTAGCACTGTTTTGCAATG-5' | 61.03 | |

Tablo 4.5. (devam) *CUBN*'in çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri.

| Ekson numarası | Primer | Ayrışma derecesi (Tm °C) | Ampilikon Uzunluğu (bp) |
|----------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Ekson 23 | 5'-CACATTCCAGAATGGCTTATTG-3' | 59.47 | 426 |
| | 3'-GGAGCTTTGCAGAGAATTTCC-5' | 61.69 | |
| Ekson 24 | 5'-TAATGTTTGCAATCCCAAAGTTC-3' | 58.60 | 342 |
| | 3'-ATCCCAGAATCAAGAAACCAATC-5' | 59.84 | |
| Ekson 25 | 5'-AAAAGATTCAATTTCCCCAGAAG-3' | 58.43 | 304 |
| | 3'-AAAATAAGTGCATTGTGCGTTG-5' | 59.61 | |
| Ekson 26 | 5'-TTATTTTCATGGCTATTCTTTTG-3' | 57.52 | 675 |
| | 3'-TCACTGAATTGCAACTCTCTCAG-5' | 60.05 | |
| Ekson 27 | 5'-CTTTCACTATGAAAATACTGCACC-3' | 57.14 | 511 |
| | 3'-GGTGGTTGGTGTGTTATAGATGC-5' | 60.36 | |
| Ekson 28 | 5'-AGGAACAGCTTTTGCTACTTGTG-3' | 59.67 | 344 |
| | 3'-TGGTATTGTTTCTAAGTTTGGAAGT-5' | 59.88 | |
| Ekson 29 | 5'-GGTTTTCTCCTAAATTAAGCATTG-3' | 57.63 | 412 |
| | 3'-CCATGTCTACCAAATGATCACC-5' | 57.33 | |
| Ekson 30 | 5'-ATAATCATAGAACCCAAGGAGCC-3' | 59.34 | 292 |
| | 3'-GTGTAGCCTTCATACGTTTTCCC-5' | 60.18 | |
| Ekson 31 | 5'-TAATGGATTATTTTCGAGCATCC-3' | 57.64 | 295 |
| | 3'-GCTTATATGGCAGTGTTTTGACC-5' | 59.92 | |
| Ekson 32 | 5'-AGTTCGTGGAATACAGGCCTTC-3' | 60.07 | 297 |
| | 3'-TCATTTCACTGTTGCACCAAAC-5' | 59.09 | |
| Ekson 33 | 5'-TTGTACGGTCAGTAGAAATGAAAAG-3' | 59.27 | 253 |
| | 3'-CATAGACTGACCTTCCCACAGAC-5' | 60.56 | |
| Ekson 34 | 5'-TCTCCCTGTATGTTTTATTTGCC-3' | 60.14 | 240 |
| | 3'-CGGATCTATAAATAAAGCACAGCC-5' | 60.34 | |
| Ekson 35 | 5'-CTAGAAACAGCGGTCTCTGCC-3' | 60.54 | 266 |
| | 3'-AGAGTCCCAATAACAAACCAAG-5' | 59.74 | |
| Ekson 36 | 5'-CATTGATAATGGCTCTAGCGTTC-3' | 60.13 | 307 |
| | 3'-ACGTACACTATGAGTTGCCCATC-5' | 59.92 | |
| Ekson 37 | 5'-AAAAGTGAACGGGTTAACCTAGC-3' | 59.20 | 398 |
| | 3'-CTCTCCCTTGCCCTTATTGAG-5' | 57.02 | |
| Ekson 38 | 5'-AAAGTCCATCCTTTTCAACACC-3' | 60.09 | 363 |
| | 3'-TGCTTGAATAGACGTTACCTTGG-5' | 60.52 | |
| Ekson 39 | 5'-TTCTCTGGCAGTATGTGTTTTAAG-3' | 57.73 | 481 |
| | 3'-ATCTGAACATATGGTGGAAGGG-5' | 60.32 | |
| Ekson 40 | 5'-TCTTTTCAGTAGAGGGCTGTAC-3' | 59.94 | 400 |
| | 3'-GAGGCAGTATGCAAGTCTGATG-5' | 59.66 | |
| Ekson 41 | 5'-TTGTTCCCTTTCTTTCAACG-3' | 57.85 | 216 |
| | 3'-GAGGAGATGAGATAACATGGGATT-5' | 59.71 | |
| Ekson 42 | 5'-TAAATAACCGACCTTTGTTTCTTTGT-3' | 58.26 | 238 |
| | 3'-ATTAGAAAGGGTAGCAGCAAGACCTAC-5' | 58.94 | |
| Ekson 43 | 5'-AGTTGATGAAATTTTAATTTGTCTTTCC-3' | 59.64 | 274 |
| | 3'-AAGAAAATTTTATATCAAAGAAGATCAAGC-5' | 60.52 | |
| Ekson 44 | 5'-ACTGATTTAAGTGTGTTTGCTCACAG-3' | 59.74 | 248 |
| | 3'-AAAATACTAACTTGGGGTAGGAAAAA-5' | 57.69 | |

Tablo 4.5. (devam) *CUBN*'in çoğaltılmasında kullanılan PZR primerleri.

| Ekson numarası | Primer | Ayrışma derecesi (T _m °C) | Ampilikon Uzunluğu (bp) |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Ekson 45 | 5'-GTAAGTAAGGTTGTCATTATCAAATAAGC-3' | 58.74 | 249 |
| | 3'-ATGTACCCCTGAACCTAAAATAAAAGTT-5' | 59.85 | |
| Ekson 46 | 5'-CAATCTTTCTTGCTTGCTTGC-3' | 60.15 | 300 |
| | 3'-AACACCCAAAAGAGAGCAGA-5' | 57.51 | |
| Ekson 47 | 5'-AAAGGAAATCAATCACTTGGACA-3' | 59.86 | 233 |
| | 3'-GCAGGTGCTCAATGTTGTGT-5' | 59.76 | |
| Ekson 48 | 5'-GCTTTTTCCCCACGTCAG-3' | 59.21 | 218 |
| | 3'-GCGGCAGGGAACACTTAC-5' | 59.25 | |
| Ekson 49 | 5'-GGATTGTGTGCCTGAAGGTT-3' | 59.97 | 237 |
| | 3'-GGGGGCATTTACAACATCCT-5' | 60.94 | |
| Ekson 50 | 5'-TGTATCAATGATGGCACTTGG-3' | 61.02 | 294 |
| | 3'-TCAGCCACAACCAATTAATA-5' | 58.62 | |
| Ekson 51 | 5'-TGTTGCAGTTAACAGAGACACAC-3' | 59.84 | 507 |
| | 3'-AAATTTCTAGATATCAGCCACAACC-5' | 59.05 | |
| Ekson 52 | 5'-ACTTACTTTGGCATTATCGGTTT-3' | 57.85 | 252 |
| | 3'-GGACAGGCTATTGTGGTTCTATTG-5' | 59.61 | |
| Ekson 53 | 5'-CAAAATTAACGATTTGTAAGGGC-3' | 58.84 | 385 |
| | 3'-GCCTGATGTAAGTAGGTACAAAATG-5' | 59.46 | |
| Ekson 54 | 5'-TGTTCTTCTGTAGCAGTCTTGAG-3' | 60.11 | 328 |
| | 3'-GCTTAAACACTAATGTTTACAAAACC-5' | 59.48 | |
| Ekson 55 | 5'-GCATTAATAATGATGGGAAACC-3' | 59.84 | 275 |
| | 3'-CTGCCTGTGACAACCACACTC-5' | 60.79 | |
| Ekson 56 | 5'-CCATTTGGAATATCTCAGGGAAC-3' | 60.20 | 338 |
| | 3'-AACTGGATTTAGCCACTCTACAAC-5' | 58.00 | |
| Ekson 57 | 5'-ATGGCCTTAATTGTTTGTGTAGG-3' | 59.05 | 337 |
| | 3'-TGAATCGCAGTGAAACTCTTTG-5' | 59.02 | |
| Ekson 58 | 5'-TTTCCATGCTGGGACTAATCG-3' | 60.99 | 268 |
| | 3'-ATGAGAATCAGTGCCCTCCATC-5' | 60.33 | |
| Ekson 59 | 5'-CAAATTTGGCTAAACTTTGAACTG-3' | 60.40 | 502 |
| | 3'-AAAGCAATCATAATCAGGTGGG-5' | 60.16 | |
| Ekson 60 | 5'-TGTACAATGTAAGGTCGTTCTG-3' | 59.07 | 348 |
| | 3'-TCCTGTAACGATATAAACTGGAATAC-5' | 58.54 | |
| Ekson 61 | 5'-GAAGTAATGAATTGTTTTCTTCTCA-3' | 57.32 | 258 |
| | 3'-GGGCATTCTTTTCAGTGCAT-5' | 60.08 | |
| Ekson 62 | 5'-GCTTTTTCTCCCTCTCCAG-3' | 60.32 | 284 |
| | 3'-TTCATCATGGCTTCATTACTTCA-5' | 59.13 | |
| Ekson 63 | 5'-TTTGGCTCCCATTTTCATTT-3' | 59.88 | 191 |
| | 3'-AGATGAAGTTCCTGGCCTCA-5' | 59.80 | |
| Ekson 64 | 5'-TGCGTACATTAATTATGCCTATTTTT-3' | 59.36 | 246 |
| | 3'-TCATTCAAACGATATTCAAATGC-5' | 59.00 | |
| Ekson 65 | 5'-TTAATAATGAATGACTCCTTCCTAAAG-3' | 57.70 | 243 |
| | 3'-CCTCATGTTTTCTCACAGTGC-5' | 59.78 | |
| Ekson 66 | 5'-TCCTGTCCTGTTTTCTTGC-3' | 60.23 | 293 |
| | 3'-AACAAATGGGAATATAAAATGTTT-5' | 57.56 | |
| Ekson 67 | 5'-GGCTAACATTCCTAGAAAAACG-3' | 57.20 | 218 |
| | 3'-GCAGAGGGAAAGTGCTGAGT-5' | 59.60 | |



Şekil 4.4. A2410 ailesinde *CUBN* ekson 53: c.8355delA (p.S2785fsX19) mutasyonu.

IV) *CUBN* mutasyonuna sahip başka ailelerin varlığını araştırmak için, çocukluk çağı SDNS'ine sahip olan ve homozigotluk haritalaması yapılmış araştırma grubu, *CUBN* lokusunda homozigot olup olmadıkları açısından araştırılmıştır. Araştırma grubu içinden 4 bireyin (A155-21, A849-21, A1605-21 ve A2591-21) *Affymetrix GeneChip Human Mapping 250K Styl* çip platformunda haritalanması sonucu *CUBN* lokusunda en az 2 megabazlık homozigot segment içerdiği bulunmuştur. Ancak bu bireylerin DNA dizi analizi sonucunda *CUBN*de mutasyon bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA

Araştırmada homozigotluk haritalaması ve eksom saptama/yüksek ölçekli dizileme tekniklerinin birleştirilmesiyle iki kardeşin proteinüri sebebinin *CUBN* bir baz çifti uzunluğunda homozigot delesyon olduğu gösterilmiştir ve *CUBN* resesif mutasyonlarının proteinüriye neden olan yeni bir gen olduğu bulunmuştur.

CUBN (*CUBN*: OMIM ID #602997) mutasyonları, megaloblastik aneminin monogenik bir türü olan ve hatalı intestinal vitamin B12 absorpsiyonu ve/veya defektif renal tübüler protein reabsorpsiyonundan kaynaklanan Imerslund-Grösbeck sendromuna (IGS; OMIM ID#261100) sebep olmaktadır. Çalışmada proteinuriden sorumlu olarak *CUBN* mutasyonlarının bulunması, aralıklı proteinürinin *CUBN* mutasyonu taşıyan IGS'li bireylerde çok nadir olması nedeniyle, nefrotik sınırdaki proteinüriye neden olması aslında beklenmedik bir bulgudur. *CUBN*'in böbreğe olan etkisi yakın zamanda *knockout* fare modelinde araştırılmıştır (68). Proksimal tübül hücrelerinin reseptör protein *amnionless*'i plazma membranına *cubilin*'in olmadığı durumda lokalize edemediği ve fonksiyonel membran reseptör kompleksi oluşumu için *amnionless* ve *cubilin*'in birbirlerine bağlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *cubilin* proteininin ablasyona uğradığı farelerde, proksimal tübüler hücrelerden albümin geri emiliminin azaldığı ve proteinüriye sebep olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle proksimal tübüler hücrelerden albümin geri alımı için *cubilin*'in esansiyel olduğu belirtilmiştir (68). Yakın zamanda yapılan bir genom ölçekli ilişkilendirme çalışmasında da *CUBN*'deki bir yanlış anlamlı varyantın (I2984V) idrar albümin-kreatinin oranıyla ve mikroalbuminüriye olan ilgisi gösterilmiştir (69).

Yapılan çalışmada, homozigotluk haritalaması ile eksom saptama/yüksek ölçekli dizileme tekniklerinin birleştirildiği bir yaklaşımın, tanı konamamış genetik hastalık sahibi bireylerin değerlendirilmesi için bir araç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Kullanılan teknik ile *CUBN*'de yeni bir delesyon türü mutasyon tanımlanmış, megaloblastik anemi bulguları göstermediği için tanıda IGS'den şüphelenilmemiş bir ailede proteinürinin

sebebi olarak *CUBN* resesif mutasyonu gösterilmiştir. IGS, *CUBN* mutasyonunun tüm klinik özelliklerini temsil etmektedir. Kardeşlerin henüz küçük yaşta oldukları için megaloblastik anemi bulgularını göstermediği düşünülmüştür. Araştırma, moleküler genetiğin klinik tanıdan daha duyarlı ve doğru bir tanısal yöntem olduğuna bir örnek teşkil etmektedir.

Araştırmada elde edilen veriler, hastalığın tedavisine yön vermiştir. Daha önce yayınlanan bir çalışmada, megaloblastik anemi, selektif proteinüri ve föniküler myelosis nörolojik bulgusu olan 15 yaşındaki Alman kökenli bir kız çocuğunda *CUBN* mutasyonu varlığı ile IGS tanısı konduğu ve bu hastanın intravasküler vitamin B12 tedavisi ve takiben aralıklı intramusküler vitamin B12 enjeksiyonları ile nörolojik bulguları 2 ay içinde tamamen düzeldiği, hematolojik bulgularının 5 ay içinde normale döndüğü ve proteinürinin devam etmesine rağmen renal fonksiyonun gerilemediği belirtilmiştir (70). Bu araştırmada *CUBN* mutasyonu tespit edilen çocukların da benzer şekilde vitamin B12 tedavisinden fayda görebileceği düşünülmüştür.

Araştırma ayrıca proteinüri sahibi bireylerin tanısı konulurken IGS'in de tanıda göz önünde bulundurulması gerektiğini, bu sayede potansiyel olarak tedavi edilebilir vakaların tanımlanabileceğini göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doktora tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtildiği şekilde özetlenmiştir.

- Çalışma ile araştırma grubunu oluşturan 2056 ailenin 310'unun (%15) hastalık etyolojisi çocukluk çağı SDNS'ine sebep olan ve otozomal resesif kalıtılan *NPHS1* (16 aile), *NPHS2* (237 aile), *LAMB2* (4 aile) ve *PLCE1* (7 aile) bialelik veya dominant kalıtılan *WT1* (46 aile) monoalelik mutasyonlarla açıklandı.
- Araştırma grubu içinden SDNS ortaya çıkış yaşı hayatın ilk 3 ayında gerçekleşen 27 ailede *NPHS1*'de 3 yeni mutasyon tanımlandı (IVS 7+1 G>T, c.2930 A>G, c. 644 T>G). Bu bulgular *Nephron Clinical Practice* dergisinde yayınlandı (Bkz. Ek 3).

“Ovunc, B., Ashraf, S., Vega-Warner, V., Bockenhauer, D., Soliman Elshakhs, NA., Joseph, M. ve diğerleri. (2012) Mutation Analysis of *NPHS1* in a Worldwide Cohort of Congenital Nephrotic Syndrome Patients. *Nephron Clin Pract*, 120(3):139-146.” (71).

- SDNS'e sebep olan yeni genlerin tanımlanması için, SDNS'e sebep olduğu bilinen genler öncelikle DNA dizi analizi ile tarandı ve mutasyon saptanmayan 1746 aile arasından, ebeveynler arasında akrabalık olduğu bilinen 85 aile homozigotluk haritalaması ile incelendi ve cZLR *peak*'lerinin gösterdiği homozigot segmentlerin toplam genetik uzunluğunun 16 ile 130 megabaz arasında olduğu belirlendi.
- 85 aile arasından birden fazla hastalıktan etkilenen kardeşin olduğu 19 aile seçildi ve 19 aile arasından bir aile (A 2410) etnik köken, klinik özellikleri ve tedaviye cevap özellikleri açısından dikkat çekiçi olduğu için eksom saptama/yüksek ölçekli dizileme ile ileri analiz edildi.

- A2410-21 ve A2410-22 kardeşleri için parametrik olmayan LOD değerleri, iki kardeş birlikte olarak hesaplandı ve kromozom 3, 10, 14, 17, 21 ve 22'de *homozygosity by descent*'i işaret eden cZLR *peak*'leri bulundu.
- A2410-22 bireyi eksom saptama/yüksek ölçekli dizileme tekniğiyle incelendi, elde edilen veriler analiz edildikten sonra tanımlanan varyant sayısı 48'e indirildi. Bu 48 varyant arasından 11 tanesinin sinonim olmadığı ve homozigot segmentlere yerleşmiş olduğu tanımlandı. Bu varyantlardan sadece bir tanesinin delesyon olduğu belirlendi. Bu sayede *CUBN (cubilin)* geni 53'üncü eksondaki bir bazçifti uzunluğundaki homozigot delesyonun (c.8355delA) çerçeve kaymasına neden olarak kodlanan proteinin erken sonlandırılmasından (p.S2785fsX19) sorumlu olduğu bulundu.
- DNA dizi analiziyle mutasyonun hastalıktan etkilenen kardeşlerde homozigot; ebeveynlerinde ise heterozigot olarak varlığı gösterildi. Mutasyonun kontrol bireylerde olmadığı *1000 genome project* veri bankasıyla karşılaştırılarak görüldü. Ayrıca etnik olarak eş 92 sağlıklı kontrol bireyin ilgili mutasyon için DNA dizi analizi ile incelenmesi sonucu da mutasyon sağlıklı bireylerde bulunmadı. Bu veriler *Journal of American Society of Nephrology* dergisinde yayınlandı (Bkz. Ek 4).

“Ovunc, B., Otto, E.A., Vega-Warner, V., Saisawat, P., Ashraf, S., Ramaswami, G.ve diğerleri. (2011) Exome sequencing reveals *cubilin* mutation as a single-gene cause of proteinuria. J Am Soc Nephrol, 22(10):1815-1820.” (72)

Öneriler

- Bu araştırmada çocukluk çağı SDNS'ine sebep olan yeni bir gen homozigotluk haritalaması ile eksom saptama/yüksek ölçekli dizileme tekniklerinin birleştirilmesiyle tanımlanmıştır.

- Araştırmanın sonuçları doğrultusunda, ebeveynleri arasında akrabalık bulunan ailelerden gelen ve henüz tanı almamış hastaların değerlendirilmesinde homozigotluk haritalaması ile eksom saptama/yüksek ölçekli dizileme tekniklerinin birleştirilmesi bir tanı yöntemi olarak önerilmektedir.
- Proteinürisi olan hastalarda potansiyel olarak tedavi edilebilir varyantların tespiti için Imlerslund-Grösbeck Sendromunun ayırıcı tanıda düşünülmesi önerilmektedir.
- *CUBN*'den sentezlenen *cubilin* proteininin nefrotik sınırdaki proteinüriye nasıl sebep olduğunun daha iyi anlaşılabilmesi için, SDNS patogeneziindeki fonksiyonel karakterizasyonun *co-immunoprecipitation* ve *co-localization* çalışmaları ile yapılması önerilmektedir.
- Hastalık fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi ve ilaç tedavilerinin denenebilmesi için hastalığın hayvanlarda modellenmesi önerilmektedir. Bu hastalığın resesif kalıtılması nedeniyle, gen *knockdown/knockout* ile hayvanlarda modelleme imkanı ile oldukça güçlü bir çalışma yapmaya olanak sağlayacaktır. Fare ve zebrafish gibi hayvan modelleri ilaç araştırmalarına imkan verecek, tedavi için yeni moleküler hedeflerin tanımlanmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. APN. (1988). Short versus standart prednisone therapy for initial treatment of idiopathic nephrotic syndrome in children. *Lancet*, 380-383.
2. Kestila, M., Lenkkeri, U., Mannikko, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., ve diğeri. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein, nephrin, is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*, 1(4), 575-582.
3. Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., ve diğeri. (2000). NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*, 24(4), 349-354. Erratum in: *Nat Genet*, 25(1), 125.
4. Karle, S.M., Uetz, B., Ronner, V., Glaeser, L., Hildebrandt, F., Fuchshuber, A. (2002). Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 13(2), 388-393.
5. Ruf, R.G., Lichtenberger, A., Karle, S.M., Haas, J.P., Anacleto, F.E., Schultheiss, M., ve diğeri. (2004). Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 15(3), 722-732.
6. Zenker, M., Aigner, T., Wendler, O., Tralau, T., Müntefering, H., Fenski, R., ve diğeri. (2004). Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet*, 13(21), 2625-2632.
7. Hasselbacher, K., Wiggins, R.C., Matejas, V., Hinkes, B.G., Mucha, B., Hoskins, B.E., ve diğeri (2006). Recessive missense mutations in LAMB2 expand the clinical spectrum of LAMB2-associated disorders. *Kidney Int*, 70(6), 1008-1012.
8. Hinkes, B., Wiggins, R.C., Gbadegesin, R., Vlangos, C.N., Seelow, D., Nürnberg, G., ve diğeri. (2006). Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nature Genet*, 38(12), 1397-1405.
9. Mucha, B., Ozaltin, F., Hinkes, B.G., Hasselbacher, K., Ruf, R.G., Schultheiss, M., ve diğeri. (2006). Mutations in the Wilms' tumor 1 gene cause isolated steroid resistant nephrotic syndrome and occur in exons 8 and 9. *Pediatr Res*, 59(2), 325-331.
10. Hinkes, B.G., Mucha, B., Vlangos C.N., Gbadegesin, R., Liu, J., Hasselbacher, K., ve diğeri. (2007). Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2). *Pediatrics*, 199(4), e907-919.
11. Hildebrandt, F., Heeringa, S.F., Rüschenhoff, F., Attanasio, M., Nürnberg, G., Becker, C., ve diğeri. (2009). A systematic approach to

- mapping recessive disease genes in individuals from outbred populations. *PLoS Genet*, 5(1), e1000353.
12. Zivcicjak, M., Franke, D., Zenker, M., Hoyer, J., Lücke, T., Pape, L., Ehrich, J.H. (2009). SMARCAL1 mutations: a cause of prepubertal idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Res*, 65(5), 564-568.
 13. Diomedi-Camassei, F., Di Giandomenico, S., Santorelli, F.M., Caridi, G., Piemonte, F., Montini, G., ve diğerleri. (2007). COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol*, 18(10), 2773-2780.
 14. López, L.C., Schuelke, M., Quinzii, C.M., Kanki, T., Rodenburg, R.J., Naini, A., ve diğerleri. (2006). Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet*, 79(6), 1125-1129.
 15. Peng, M., Falk, M.J., Haase, V.H., King, R., Polyak, E., Selak, M., ve diğerleri. (2008). Primary coenzyme Q deficiency in Pdss2 mutant mice causes isolated renal disease. *PLoS Genet*, 4(4), e1000061.
 16. Heeringa, S.F., Chernin, G., Chaki, M., Zhou, W., Sloan, A.J., Ji, Z., ve diğerleri. (2011). COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *J Clin Invest*, 121(5), 2013-2024.
 17. Berkovic, S.F., Dibbens, L.M., Oshlack, A., Silver, J.D., Katerelos, M., Vears, D.F., ve diğerleri. (2008). Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis. *Am J Hum Genet*, 82(3), 673-684.
 18. Kaplan, J.M., Kim, S.H., North, K.N., Rennke, H., Correia, L.A., Tong, H.Q., ve diğerleri. (2000). Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet*, 24(3), 251-256.
 19. Shih, N.Y., Li, J., Karpitskii, V., Nguyen, A., Dustin, M.L., Kanagawa, O., ve diğerleri. (1999). Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science*, 286(5438), 312-315.
 20. Winn, M.P., Conlon, P.J., Lynn, K.L., Farrington, M.K., Creazzo, T., Hawkins, A.F., ve diğerleri. (2005). A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*, 308(5729), 1801-1804.
 21. Huttunen, N.P. (1976). Congenital nephrotic syndrome of Finnish type. Study of 75 patients. *Arch Dis Child*, 51(5), 344-348.
 22. Holmberg, C., Tryggvasson, K., Kestila, M., Jalanko, H. (2004). Congenital Nephrotic Syndrome. In: Avner E, Harmon WE, Niaudet P (Eds.). *Pediatric Nephrology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

23. Tryggvason, K., Patrakka, J., Wartiovaara, J. (2006). Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med*, 354(13), 1387-1401.
24. Somlo, S., Mundel, P. (2000). Getting a foothold in nephrotic syndrome. *Nat Genet*, 24(4), 333-335.
25. Faul, C., Donnelly, M., Merscher-Gomez, S., Chang, Y.H., Franz, S., Delfgaauw, J., ve diğerleri. (2008). The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med*, 14(9), 931-938.
26. Jefferson, J.A., Shankland, S.J. (2007). Familial nephrotic syndrome: PLCE1 enters the fray. *Nephrol Dial Transplant*, 22(7), 1849-1852.
27. Chaib, H., Hoskins, B.E., Ashraf, S., Goyal, M., Wiggins, R.C., Hildebrandt, F. (2008). Identification of BRAF as a new interactor of PLCepsilon1, the protein mutated in nephrotic syndrome type 3. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294(1), F93-99.
28. Machuca, E., Benoit, G., Antignac, C. (2009). Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Hum Mol Genet*, 18(R2), R185-194.
29. Hildebrandt, F. (2010). Genetic kidney diseases. *Lancet*, 375(9722), 1287-1295.
30. Chernin, G., Heeringa, S.F., Gbadegesin, R., Liu, J., Hinkes, B.G., Vlangos, C.N., ve diğerleri. (2008). Low prevalence of NPHS2 mutations in African American children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 23(9), 1455-1460.
31. He, N., Zahirieh, A., Mei, Y., Lee, B., Senthilnathan, S., Wong, B., ve diğerleri. (2007). Recessive NPHS2 (Podocin) mutations are rare in adult-onset idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2(1), 31-37.
32. Fuchshuber, A., Gribouval, O., Ronner, V., Kroiss, S., Karle, S., Brandis, M., Hildebrandt, F. (2001). Clinical and genetic evaluation of familial steroid-responsive nephrotic syndrome in childhood. *J Am Soc Nephrol*, 12(2), 374-378.
33. Chernin, G., Vega-Warner, V., Schoeb, D.S., Heeringa, S.F., Ovunc, B., Saisawat, P., ve diğerleri; Members of the GPN Study Group. (2010). Genotype/phenotype correlation in nephrotic syndrome caused by WT1 mutations. *Clin J Am Soc Nephrol*, 5(9), 1655-1662.
34. Heeringa, S.F., Möller, C.C., Du, J., Yue, L., Hinkes, B., Chernin, G., ve diğerleri. (2009). A novel TRPC6 mutation that causes childhood FSGS. *PLoS One*, 4(11), e7771.
35. Hildebrandt, F., Heeringa, S.F. (2009). Specific podocin mutations determine age of onset of nephrotic syndrome all the way into adult life. *Kidney Int*, 75(7), 669-671.

36. Bockenbauer, D., van't Hoff, W., Chernin, G., Heeringa, S.F., Sebire, N.J. (2009). Membranoproliferative glomerulonephritis associated with a mutation in Wilms' tumour suppressor gene 1. *Pediatr Nephrol*, 24(7), 1399-1401.
37. Matejas, V., Hinkes, B., Alkandari, F., Al-Gazali, L., Annexstad, E., Aytac, M.B., ve diğerleri. (2010). Mutations in the human laminin beta2 (LAMB2) gene and the associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat*, 31(9), 992-1002.
38. Ozaltin, F., Heeringa, S., Poyraz, C.E., Bilginer, Y., Kadayifcilar, S., Besbas, N., ve diğerleri. (2008). Eye involvement in children with primary focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*, 23(3), 421-427.
39. Baskin, E., Selda Bayrakci, U., Alehan, F., Ozdemir, H., Oner, A., Horvath, R., ve diğerleri. (2011). Respiratory-chain deficiency presenting as diffuse mesangial sclerosis with NPHS3 mutation. *Pediatr Nephrol*, 26(7), 1157-1161.
40. Choi, H.J., Lee, B.H., Kang, J.H., Jeong, H.J., Moon, K.C., Ha, I.S., ve diğerleri. (2008). Variable phenotype of Pierson syndrome. *Pediatr Nephrol*, 23(6), 995-1000.
41. Hinkes, B., Vlangos, C., Heeringa, S., Mucha, B., Gbadegesin, R., Liu, J., ve diğerleri. (2008). Specific podocin mutations correlate with age of onset in steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 19(2), 365-371.
42. Heeringa, S.F., Vlangos, C.N., Chernin, G., Hinkes, B., Gbadegesin, R., Liu, J., ve diğerleri; Members of the APN Study Group. (2008). Thirteen novel NPHS1 mutations in a large cohort of children with congenital nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 23(11), 3527-3533.
43. Gbadegesin, R., Hinkes, B., Vlangos, C., Mucha, B., Liu, J., Hopcian, J., Hildebrandt, F. (2007). Mutational analysis of NPHS2 and WT1 in frequently relapsing and steroid-dependent nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 22(4), 509-513.
44. Ruf, R.G., Schultheiss, M., Lichtenberger, A., Karle, S.M., Zalewski, I., Mucha, B., ve diğerleri; APN Study Group. (2004). Prevalence of WT1 mutations in a large cohort of patients with steroid-resistant and steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 66(2), 564-570.
45. Schoeb, D.S., Chernin, G., Heeringa, S.F., Matejas, V., Held, S., Vega-Warner, V., ve diğerleri. Nineteen novel NPHS1 mutations in a worldwide cohort of patients with congenital nephrotic syndrome (CNS). *Nephrol Dial Transplant*, 25(9), 2970-2976.
46. Billing, H., Müller, D., Ruf, R., Lichtenberger, A., Hildebrandt, F., August, C., ve diğerleri. (2004). NPHS2 mutation associated with recurrence of proteinuria after transplantation. *Pediatr Nephrol*, 19(5), 561-564.

47. Soliman, N.A., Francis, M., Heeringa, S.F., Chernin, G. (2009). Complete remission of nephrotic syndrome in an infant with focal segmental glomerulosclerosis: is it renin-angiotensin blockade? *Pediatr Nephrol*, 24(5), 1065-1070.
48. Copelovitch, L., Gutenberg, M., Pollak, M.R., Kaplan, B.S. (2007). Renin-angiotensin axis blockade reduces proteinuria in presymptomatic patients with familial FSGS. *Pediatr Nephrol*, 22(10), 1779-1784.
49. Zhou, W., Hildebrandt, F. (2009). Molecular cloning and expression of phospholipase C epsilon 1 in zebrafish. *Gene Expr Patterns*, 9(5), 282-288.
50. Kos, C.H., Le, T.C., Sinha, S., Henderson, J.M., Kim, S.H., Sugimoto, H., ve diğerleri. (2003). Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest*, 111(11), 1683-1690.
51. Kramer-Zucker, A.G., Wiessner, S., Jensen, A.M., Drummond, I.A. (2005). Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephtrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes. *Dev Biol*, 285(2), 316-329.
52. Zhou, W., Hildebrandt, F. (2012). Inducible podocyte injury and proteinuria in transgenic zebrafish. *J Am Soc Nephrol*, 23(6), 1039-1047.
53. Saiki, R., Lunceford, A.L., Shi, Y., Marbois, B., King, R., Pachuski, J., ve diğerleri. (2008). Coenzyme Q10 supplementation rescues renal disease in Pdss2kd/kd mice with mutations in prenyl diphosphate synthase subunit 2. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295(5), F1535-1544.
54. Cooper, D.N., Krawczak, M., Antonorakis, S.E. (1995). The nature and mechanisms of humangene mutation. Scriver, C., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th Ed (s. 259-291). New York: McGraw-Hill.
55. Altshuler, D., Daly, M.J., Lander, E.S. (2008). Genetic mapping in human disease. *Science*, 322(5903), 881-888.
56. Frazer, K.A., Murray, S.S., Schork, N.J., Topol, E.J. (2009). Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet*, 10(4), 241-251.
57. Choi, M., Scholl, U.I., Ji, W., Liu, T., Tikhonova, I.R., Zumbo, P., ve diğerleri. (2009). Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(45), 19096-19101.
58. Ng, S.B., Buckingham, K.J., Lee, C., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Dent, K.M., ve diğerleri. (2010). Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet*, 42(1), 30-35.
59. Ng, S.B., Bigham, A.W., Buckingham, K.J., Hannibal, M.C., McMillin, M.J., Gildersleeve, H.I., ve diğerleri. (2010). Exome sequencing

- identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet*, 42(9), 790-793.
60. Hoischen, A., van Bon, B.W., Rodríguez-Santiago, B., Gilissen, C., Vissers, L.E., de Vries, P., ve diğerleri. (2011). Related citations De novo nonsense mutations in ASXL1 cause Bohring-Opitz syndrome. *Nat Genet*, 43(8), 729-731.
 61. Otto, E.A., Hurd, T.W., Airik, R., Chaki, M., Zhou, W., Stoetzel, C. ve diğerleri. (2010). Candidate exome capture identifies mutation of SDCCAG8 as the cause of a retinal-renal ciliopathy. *Nat Genet*, 42(10), 840-850.
 62. Lander, E.S., Botstein, D. (1987). Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science*, 236(4808), 1567-1570.
 63. Zeiger, J.S., Hetmanski, J.B., Beaty, T.H., VanderKolk, C.A., Wyszynski, D.F., Bailey-Wilson, J.E., ve diğerleri. (2003). Evidence for linkage of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate to a region on chromosome 2. *Eur J Hum Genet*, 11(11), 835-839.
 64. Zhang, L., Yang, W., Ying, D., Cherny, S.S., Hildebrandt, F., Sham, P.C., Lau, Y.L. (2011). Homozygosity mapping on a single patient: identification of homozygous regions of recent common ancestry by using population data. *Hum Mutat*, 32(3), 345-353.
 65. Kruglyak, L., Daly, M.J., Reeve-Daly, M.P., Lander, E.S. (1996). Parametric and nonparametric linkage analysis: A unified multipoint approach. *Am J Hum Genet*, 58(6), 1347-1363.
 66. Gudbjartsson, D.F., Jonasson, K., Frigge, M.L., Kong, A. (2000). Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis. *Nat Genet*, 25(1), 12-13.
 67. Ruschendorf, F., Nurnberg, P. (2005). ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10 K SNP array veri. *Bioinformatics*, 21(9), 2123-2125.
 68. Amsellem, S., Gburek, J., Hamard, G., Nielsen, R., Willnow, T.E., Devuyst, O., Nexø, E. ve diğerleri. (2010). Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*, 21(11), 1859-1867.
 69. Böger, C.A., Chen, M.H., Tin, A., Olden, M., Köttgen, A., de Boer, I.H., Fuchsberger, C. ve diğerleri. (2011). CUBN is a gene locus for albuminuria. *J Am Soc Nephrol*, 22(3), 555-570.
 70. Hauck, F.H., Tanner, S.M., Henker, J., Laass, M.W. (2008). Imerslund-Grösbeck syndrome in a 15-year old German girl caused by compound heterozygous mutations in CUBN. *Eur J Pediatr*, 167(6), 671-675.
 71. Ovunc, B., Ashraf, S., Vega-Warner, V., Bockenbauer, D., Soliman Elshakhs, N.A., Joseph, M. ve diğerleri. (2012). Mutation Analysis of NPHS1 in a Worldwide Cohort of Congenital Nephrotic Syndrome Patients. *Nephron Clin Pract*, 120(3), c139-146.

72. Ovunc, B., Otto, E.A., Vega-Warner, V., Saisawat, P., Ashraf, S., Ramaswami, G., ve diğeri. (2011). Exome sequencing reveals cubilin mutation as a single-gene cause of proteinuria. *J Am Soc Nephrol*, 22(10),1815-1820.

EKLER

EK 1. Klinik Bilgi Formu



The University of Michigan
Medical Center
Ann Arbor, Michigan, USA

Friedhelm Hildebrandt, M.D.
Professor of Pediatrics and of Human Genetics
Investigator, Howard Hughes Medical Institute
Frederick G.L. Huetwell Professor for the
Cure and Prevention of Birth Defects

*University of Michigan Health System
Pediatric Nephrology
8220C MSRB III, Box 5646
1150 W. Medical Center Drive
Ann Arbor, MI 48109-5646, USA*

*Fax: +1 734-615-1386
Email: fhilde@umich.edu*

IRB 2003-0906

January 21, 2010

Mutation Analysis and Cloning of Childhood Renal Disease

Dear Colleagues,

Thank you for your interest in the mutational screening of patients with nephrotic syndrome (NS), branchio-oto-renal syndrome (BOR), or patients that have a congenital or developmental abnormality of the urinary tract.

We are performing mutational analysis in the *NPHS2*-gene (podocin) and *WT-1*-gene. Our aim is to find out whether there is any correlation between the occurrence of mutations in the *NPHS2*-gene and the clinical outcome of these patients (e.g. response to steroids and cytotoxic drugs, relapse after transplantation) (Karle et al. *J Am Soc Nephrol* 13:388, 2002). This genetic analysis is investigational and is performed in the setting of a research laboratory and there are no universal standards for the performance of these studies. The investigators endeavor to attain the highest standards in their analysis, but these analyses should not be considered diagnostic tests, rather investigational genetic tests, not intended to replace other clinical or laboratory evaluations or treatments that would otherwise be considered the standard of care.

Identification of new genes causing branchio-oto-renal syndrome will offer new insights into the pathomechanisms of hearing defects, urinary tract malformations (UTM), as well as kidney and ear development. Congenital developmental abnormalities of the human genitourinary (GU) tract account for a significant degree of morbidity seen in children possessing such lesions. Clinically these abnormalities comprise the most common causes of infant and childhood chronic renal insufficiency and ultimately renal transplantation. The purpose of this proposal is to provide critical data needed to elucidate the genetic causes that underlie these various syndromes and provide a potential screening tool for families at high risk. Additionally, insights gained from this study will provide us and the research community with new information involving the abnormal and normal development of the GU tract, which will have a potentially larger patient application in the future.

Branchio-oto-renal syndrome (BOR) is an autosomal dominant disorder with the features of renal anomalies, hearing loss, and branchial arch defects. The prevalence of BOR approximates 1:40,000 in the general population. In 1997, mutations in the *EYA1* gene were identified as causing BOR. Although disease-causing mutations in *SIX1* and *SIX5* have also recently been identified in patients, a large number of cases are still unaccounted for, suggesting that several more BOR genes are present in the genome.

Congenital urinary tract malformations (UTM) are the most common cause of end stage renal disease in the pediatric population, accounting for 32% of primary etiologies at the time of renal transplantation. Over 90% of UTM cases are non-syndromic, but congenital malformations of the urinary tract can also occur as part of over 200 syndromes. Urinary tract malformation loci are present on chromosomes 1p13, 6p21, 10q26, and a number of genes including *HNF1 β* , *PAX2*, *EYA1* and *UPIIIa* have been shown to be mutated in UTM patients. Further, BOR genes that are identified through this study may also contribute to non-syndromic cases of UTM.

These genetic tests are presently considered investigational and are part of a research protocol. There is no cost for the blood draw, shipping or processing of the samples to the patients or family members of

the patients who agree to participate in the study. Office visits for physicians or genetic counselors are not paid for by this study, nor are any other laboratory tests. Results of genetic analyses are generally available 3-6 months following the receipt of a sample. Results are transmitted directly to the corresponding physician and not to individual participants. Participants will therefore need to depend upon their local physician to communicate and explain the results of the genetic tests. The investigators would be happy to discuss the results of the genetic testing with any local physician who wishes to do so. **No results will be reported for individual participants who do not have a diagnosis of nephrotic syndrome, BOR or UTM at the time of enrollment.**

If an individual is found to have nephrotic syndrome, BOR or UTM after enrolling in the study a local physician may contact the investigators, at which time results of any genetic testing which has been performed can then be released to the local physician. Local physicians, or their representatives, are expected to review the consent document with prospective participants and indicate that they feel the participant understands the nature of the study by signing the consent document before the participant signs the consent document. In addition to the copy that is returned to the investigators, the participant and the local physician should also keep a signed copy of the consent.

We also kindly ask you to fill out a clinical questionnaire which includes not only important information on the family history, the clinical picture, the response to treatment, and extrarenal associations, but also on the ethnicity of your patient. Recent studies and our own data suggest that ethnic groups are affected differently by mutations in genes causing nephrotic syndrome, such as podocin and nephrin. Our group is interested in elucidating genotype/phenotype correlations in this disease. We, therefore, want to encourage you to describe your patient's ethnicity in as detailed a way as possible. Please feel free to check more than one box and/or use the "other" checkbox with a more detailed description.

Please return the following items to the investigators:

1. Signed consent document.
2. Health questionnaire.
3. Blood sample: 3-10ml EDTA or Na-Heparin blood for each participant.
4. Outside the U.S.: Customs Invoice (see end of document)

Blood samples without a signed consent document cannot be processed or analyzed.

As in the past, we are happy to provide free shipping of your blood samples. However, there has been abuse of our customer numbers. Therefore, we would like to kindly ask you to contact our laboratory for information on free shipping. Virginia Vega-Warner will be happy to help you and can be contacted by e-mail at v.vegaw@umich.edu. DNA samples can be shipped by regular mail.

Please e-mail us at the time of shipping with the shipping number, so that we can track the package and ensure safe delivery. Thank you again for your participation. Please do not hesitate to contact us with any questions or concerns.

Best regards,

Friedhelm Hildebrandt, M.D.

Professor of Pediatrics and of Human Genetics
Investigator, Howard Hughes Medical Institute
Frederick G. L. Huetwell Professor for Cure and Prevention of Birth Defects

Idiopathic Nephrotic Syndrome
Questionnaire, version January 25, 2008

Prof. Dr. F. Hildebrandt

Thank you very much for taking the time to fill out this form.

| General Patient Information | | | |
|--|----------------------------|--|----------------------------------|
| Last name: _____ | First name: _____ | DOB: ____/____/____ MM DD YYYY | |
| <input type="checkbox"/> M | <input type="checkbox"/> F | Height: ____ cm | Weight before illness: ____ kg |
| Consanguineous parents | | <input type="checkbox"/> Yes | <input type="checkbox"/> No |
| Relatives with nephrotic syndrome | | <input type="checkbox"/> Mother | <input type="checkbox"/> Brother |
| | | <input type="checkbox"/> Father | <input type="checkbox"/> Sister |
| | | <input type="checkbox"/> Others: _____ | |
| Ethnicity: <input type="checkbox"/> African <input type="checkbox"/> African American <input type="checkbox"/> American Indian <input type="checkbox"/> Arabic <input type="checkbox"/> Asian <input type="checkbox"/> Caucasian <input type="checkbox"/> Central Slavic | | | |
| <input type="checkbox"/> Chinese <input type="checkbox"/> European <input type="checkbox"/> Finnish <input type="checkbox"/> Hispanic <input type="checkbox"/> Indian Subcontinent <input type="checkbox"/> Japanese <input type="checkbox"/> Pacific Islander | | | |
| <input type="checkbox"/> Turkish <input type="checkbox"/> Other: _____ | | | |

I. Initial Clinical Examination: ____MM/____DD/____YYYY

1. Symptoms (initial)

- Acute event Edema
- During regular examination High blood pressure (before steroid therapy)
- need of treatment
- Other: _____

2. Laboratory Findings (initial)

- Blood studies: Creatine: ____ mg/dl Urinalysis: Proteinuria ____ g/day or
- GFR: ____ ml/min ____ g/g crea
- Serum protein: ____ g/l selective non-selective
- Albumin: ____ g/l
- Immunologic abnormalities Hematuria
- (immunoglobulins / complement Yes No
- components) following:
- _____

3. Renal Biopsy

| | 1 st Biopsy ____/____ MM/YYYY | 2 nd Biopsy ____/____ MM/YYYY | Institution |
|---|--|--|-------------|
| MCNS (minimal change nephrotic syndrome) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| FSGS (focal segmental glomerulosclerosis) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Other: _____ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

Patient's Name: _____

II. Treatment

1. Corticosteroids Yes No

Steroid sensitive

Complete response

Relapse Yes No

Partial response

Relapse Yes No

Steroid resistant

2. Cytotoxic drugs Yes No Cyclosporine Yes No

Name of drug: _____

Clinical response: _____

Clinical response: _____

3. Dialysis / Renal Transplantation MM / YYYY

Date of end stage renal failure: ____ / ____

1st transplantation: ____ / ____

2nd transplantation: ____ / ____

Unsuccessful transplantation because of:

Recurrence

Graft loss because of:

Recurrence

Rejection

Date of transplant failure: ____MM/____YYYY

III. Extrarenal Association

The patient suffers / suffered from one of the following diseases:

Deafness

Short stature

Urinary/genital tract anomalies

Blindness

Facial dysmorphism

Heart anomalies

Microcephaly

Hexadactylia

Allergies

Mental retardation

Spondyloepiphyseal dysplasia
(Schminke-disease)

Other: _____

IV. Remarks

Thank you very much for your assistance.

Please provide us with the following information in order to facilitate further correspondence.

Name: _____ Phone: _____

Address: _____ Fax: _____

Address: _____ eMail: _____

BLOOD SAMPLE COLLECTION FOR MUTATIONAL ANALYSIS

1. **Please call us** or send us an email to the below mentioned address before, or at the time when shipping the samples, so we can be certain to receive them within 2 days or otherwise trace them.
2. **Venipuncture:** Draw 5 ml **EDTA-blood** or **Na-Heparin** under **sterile** conditions (wear gloves, do not touch rim of tubes); **immediately invert tubes several times** to prevent coagulation. If syringes and tubes are being used **rinse syringe with Na-Heparin**.
3. **Storage: Always keep blood samples at room temperature! (Never chill, never freeze!)**
4. **Transport:** Send samples and filled-out forms: consent and clinical questionnaire (inside shipping envelope), customs forms (outside shipping envelope or package). Immediately address to the name below by the fastest route possible, e.g. **2-day Express Air Mail, Federal Express, DHL Worldwide Express**. Get a guarantee from the carrier to deliver samples to our destination **within 1-2 days** (regular air mail is much too slow for blood samples). Protect samples from the cold by wrapping them in gauze or packaging them in Styrofoam. Don't forget to contact us!

If you like, you can use one of our personal courier accounts. For information on the account numbers please contact Virginia Vega-Warner at [v vegaw@umich.edu](mailto:v_vegaw@umich.edu) or Professor Friedhelm Hildebrandt at fhilde@umich.edu.

Thank you for your cooperation!

Send samples to:

Prof. Dr. med. F. Hildebrandt
University of Michigan, Department of Pediatrics
1150 West Medical Center Dr, 8220C MSRB 3
Ann Arbor, Michigan 48109-5646, USA
Fax: 734-615-1386
eMail: fhilde@umich.edu



The University of Michigan
Medical Center
Ann Arbor, Michigan, USA

Friedhelm Hildebrandt, M.D.
Professor of Pediatrics and of Human Genetics
Investigator, Howard Hughes Medical Institute
Frederick G.L. Huetwell Professor for the
Cure and Prevention of Birth Defects

*University of Michigan Health System
Pediatric Nephrology
8220C MSRB III, Box 5646
1150 W. Medical Center Drive
Ann Arbor, MI 48109-5646, USA*

*Fax: +1 734-615-1386
Email: fhilde@umich.edu*

Invoice

Shipper:

Consignee:

Prof. Dr. med. F. Hildebrandt
University of Michigan, Department of Pediatrics
1150 West Medical Center Dr, 8220C MSRB 3
Ann Arbor, Michigan 48109-5646, USA

Content:

1 Parcel containing:
Documents and human blood or DNA, **non-hazardous, non-toxic, non-infectious**, sample for laboratory research use only, no commercial value.

\$ 1 value for customs purposes only.

Date / Signature

EK 2. İngilizce Aydınlatılmış Onam Formu

Study No.: IRB: 2003-0906

Consent Approved On: 01/21/10

Project Approval Expires On: 01/20/11

University of Michigan Consent To Be Part Of A Research Study

INFORMATION ABOUT THIS FORM

You, or your child, may be eligible to take part in a research study. This form gives you important information about the study. It describes the purpose of the study, and the risks and possible benefits of participating in the study. Parents or legal guardians, who are giving permission for a child, please note: in the sections that follow the word 'you' refers to 'your child.' *NOTE: Items with an "*" asterisk are for the child's understanding and assent.

Please take time to review this information carefully. After you have finished, you should talk to the researchers about the study and ask them any questions you have. You may also wish to talk to others (for example, your friends, family, or other doctors) about your participation in this study. If you decide to take part in the study, you will be asked to sign this form. *Before you sign this form, be sure you understand what the study is about, including the risks and possible benefits to you.*

(This document was prepared in December, 2009.)

1. GENERAL INFORMATION ABOUT THIS STUDY AND THE RESEARCHERS

1.1 Study title:

Mutation analysis and cloning of childhood renal disease.

1.2 Company or agency sponsoring the study:

National Institutes of Health
Doris Duke Charitable Foundation

1.3 Names, degrees, and affiliations of the researchers conducting the study:

| | | |
|---------------------------|------------------------|------------------------------------|
| Friedhelm Hildebrandt, MD | Principal Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Roger Wiggins, MD | Co-Investigator | U of M Internal Medicine |
| Jeffrey Innis, MD | Co-Investigator | U of M Human Genetics |
| Edgar Otto, PhD | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Bernward Hinkes, MD | Co-Investigator | U of Erlangen, Germany, Pediatrics |
| Christopher Vlangos, PhD | Co-Investigator | U of M Pediatric Genetics |
| Rannar Airik, PhD | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Susan Allen, MS | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Shazia Ashraf, MS | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Hassan Chaib, PhD | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Moumita Chaki, PhD | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Gil Chernin, MD | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Amiya Ghosh, PhD | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Heather Harville, BS | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Saskia Heeringa, MD | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Susanne Held, BS | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Toby Hurd, PhD | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Sabine Janssen, BS | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Sivakumar Natarajan, MS | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| John O'Toole, MD | Co-Investigator | Case Western, Ohio, Internal Med |
| Bugsu Ovunc, MD | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Gokul Ramaswami, BS | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Pawaree Saisawat, MD | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Dominik Schoeb, BS | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Virginia Vega-Warner, PhD | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |
| Weibin Zhou, PhD | Co-Investigator | U of M Pediatric Nephrology |

2. PURPOSE OF THIS STUDY

2.1 Study purpose:

Nephrotic syndrome (NS) is one of the most common kidney diseases. Branchio-oto-renal (BOR) syndrome is a genetic disorder involving the kidneys, ears, and the urinary tract. The purpose of this research is to find genes that can cause nephrotic syndrome and BOR. *NS and BOR mean that the kidneys are not doing what they should. We are trying to find why.

3. INFORMATION ABOUT STUDY PARTICIPANTS (SUBJECTS)

Taking part in this study is completely **voluntary**. You may also leave the study at any time. If you leave the study before it is finished, there will be no penalty to you, and you will not lose any benefits to which you are otherwise entitled. *You do not have to be in the study if you don't want to. Your parent (or guardian) can make sure that this study will be okay for you. Both you and your parent have to agree to you being in the study, but it is still up to you if you *want* to do it.

3.1 Who can take part in this study?

Anybody with nephrotic syndrome, or any individual that has been diagnosed with Branchio-oto-renal (BOR) syndrome, or a congenital or developmental abnormality of the urinary tract, as determined by a kidney specialist; and any first degree family members (i.e. siblings, parents or children) of these individuals are eligible to participate in this study. In cases in which the parents of the affected individual are consanguineous (i.e. they share a blood relationship) more distantly related family members may be considered eligible for the study. *If your doctor has told you that your kidneys have NS, BOR or other genetic kidney diseases, you can be in the study.

*Note: It is very **important** for you to give the researchers **accurate** and **complete** information about your medical history and condition.*

3.2 How many people (subjects) are expected to take part in this study?

3,000 subjects are expected to participate, 200 at the University of Michigan and 500 at other sites around the United States, 2,300 will be from world wide sources.

4. INFORMATION ABOUT STUDY PROCEDURES

4.1 What exactly will be done to me in this study? What kinds of research procedures will I receive if I agree to take part in this study?

In order to enroll in this study you must review this document with your doctor. If you agree to be a research subject in this study, your physician will provide information to us about your previous loss of protein by the kidney and any other relevant medical history and laboratory results that you may have had done already as a part of your health care to this point. If other members of your family are also affected by the disease, we kindly ask you to inform them of our study and we will provide you information to give them. Interested eligible family members can give us permission to contact them by sending a postcard to us that we will provide to you.

Finally, a blood sample will be obtained from a vein in your arm using the same procedures as for standard blood tests. The total amount of blood collected of an adult will correspond with approximately 4 teaspoons (corresponding 20 ml), the total amount of blood collected of a child will correspond with approximately 2 teaspoons (corresponding 10 ml). *If you want to be in the study a doctor or nurse will take some blood from your arm (it might hurt a little), or use a little brush that you put in your mouth for about 30 seconds (it will not hurt). The blood or spit on the brush is what we will use to do our tests to find out why the kidneys leak. That is all you have to do to help us.

Alternatively, we will ask you to collect cells from inside of your child's mouth and we will obtain DNA samples from the cells. To collect the cells we have provided you with a small brush known as a CytoSoft brush. The collection takes about 30 seconds and will not hurt. In order to collect good DNA it is best to collect the cells first thing in the morning before eating, drinking, and brushing teeth. It is especially important that no tea, coffee, or soda pop is consumed before the sample is taken.

***Instructions for collection:**

1. Unwrap the mouth swab by peeling at the arrow, and remove brush from packaging.
2. Place the brush in your mouth between your teeth and the inside of your cheek.
3. Run the swab firmly backwards and forwards along your cheek and in between the cheek and gum. This should be done for 30 seconds. Please time it. It is longer than you think! **There is no need for force, do not brush so hard that you bleed.**
4. When you have finished, replace the swab in the package (the used end goes in first).
5. Please send brushes along with any paperwork (for example, completed questionnaire and/or signed consent forms) in the envelope provided.
6. If you have further questions/clarification, please call the study coordinator.

We will then test your sample on mutations in genes known to cause nephrotic syndrome or other genetic kidney diseases. If you are known to have kidney disease as determined by your doctor, a report of the results of genetic testing can be sent to your doctor if you wish. These results are part of a research study and not part of a certified laboratory testing. All samples received will be saved indefinitely, unless the participant withdraws from the study. If you do not have a mutation in a known gene, we will perform further studies to identify new disease causing genes as part of this research project. This type of research can take years, if you develop kidney disease after enrolling in the study you are encouraged to inform the investigators of this change and you would be eligible to receive results of genetic testing if you desired them.

In case tissue of your kidney has been removed in the course of your disease, we ask you for permission to obtain a sample from your doctor. Please note that this procedure does not require any additional involvement of you, if you agree to the analysis of your tissue at the end of this form.

This research project is designed to identify the causes of nephrotic syndrome, BOR syndrome, and congenital or developmental abnormality of the urinary tract. The cost of office visits to local physicians or genetic counselors are not covered by this study; nor are any testing other than the blood draw for the DNA sample requested by this study.

As new knowledge on the causes of nephrotic syndrome or other genetic kidney diseases becomes available, new ideas for research projects might arise. Therefore, you will have the opportunity to let us know at the end of this document, whether or not you agree to let us use your samples for future related studies. New studies will follow the same strict ethic guidelines for your protection as this study.

4.2 How much of my time will be needed to take part in this study? When will my participation in the study be over?

To participate in this study a single visit is required to complete this consent form and to draw blood. In rare cases (e.g. because of problems with processing the sample), a second visit to draw an additional blood sample might be necessary. This will take approximately one hour. The DNA taken from the blood sample will be stored indefinitely for the evaluation of the genetic causes of nephrotic syndrome or other genetic kidney diseases exclusively as described in this document.

4.3 When will my participation in the study be over?

As stated above (see question 4.2), the DNA taken from the blood sample will be stored indefinitely for the evaluation of the genetic causes of nephrotic syndrome or other genetic kidney diseases exclusively as described in this document. *We will keep your samples until we are done studying them.

5. INFORMATION ABOUT RISKS AND BENEFITS**5.1 What risks will I face by taking part in the study? What will the researchers do to protect me against these risks?**

The known or expected risks are:

- The risks for a routine venous blood draw which include discomfort, bruising, faintness or lightheadedness and very rarely infection.

- The risk for identifying a genetic cause of disease can include difficulty in obtaining insurance or increased cost of insurance. However, since insurance companies do not cover the costs for genetic testing, blood draws for genetic testing or shipping and handling of the blood for genetic testing in this study they are not entitled to the results of this study. The investigators will not disclose any findings of this study to anyone other than the participant's private physician. If desired the researchers will not report any results to the participant's private physician.
- The risk for learning of a genetic cause of disease may cause the participant emotional distress which could result in depression or anxiety. We hope to minimize distress caused by this information as we report only for individuals who are already aware that they have kidney disease and therefore, this information will only provide a definitive diagnosis for people who are already known to have kidney disease.

As with any research study, there may be additional risks that are unknown or unexpected.

- The blood draw will be performed in a controlled environment using antiseptic technique. Your insurability will not be jeopardized by the investigators, as no information from this study is shared with anyone other than the participant's private physician if so desired.
- Please consider the emotional impact that receiving the results of this study will have for you. Your participation in this study does not require that the results of the study be reported to your physician. If you do not understand potential ramifications of learning the results of this study you are encouraged to discuss these with your local physician, the investigators or obtain genetic counseling prior signing this consent and enrolling in the study. This study does not cover the costs of genetic counseling or physician visits to review or discuss results of this study before or after results become available.

5.2 What happens if I get hurt, become sick, or have other problems as a result of this research?

The researchers have taken steps to minimize the risks of this study. Even so, you may still have problems or side effects, even when the researchers are careful to avoid them. Please tell the researchers listed in Section 10 about any injuries, side effects, or other problems that you have during this study. You should also tell your regular doctors.

The University of Michigan will provide first aid or emergency care. Additional medical care will be provided if the University determines that it is responsible to provide such treatment. If you sign this form, you do not give up your right to seek additional compensation if you are harmed as a result of being in this study.

5.3 If I take part in this study, can I also participate in other studies?

Being in more than one research study at the same time, or even at different times, may increase the risks to you. It may also affect the results of the studies. You should not take part in more than one study without approval from the researchers involved in each study.

5.4 How could I benefit if I take part in this study? How could others benefit?

You may not receive any personal benefits from being in this study. Some people find satisfaction in contributing to scientific knowledge about genetic problems and their medical consequences. Others could benefit in the future by improved diagnostic and therapeutic procedures.

5.5 Will the researchers tell me if they learn of new information that could change my willingness to stay in this study?

Yes, the researchers will tell you if they learn of important new information that may change your willingness to stay in this study. If new information is provided to you after you have joined the study, it is possible that you may be asked to sign a new consent form that includes the new information.

6. OTHER OPTIONS

6.1 If I decide not to take part in this study, what other options do I have?

If you do not want to participate in this study, there will be no penalty. In this case, we cannot offer you genetic testing for nephrotic syndrome or other genetic kidney diseases. Ask your doctor about other options you may have.

7. ENDING THE STUDY

7.1 If I want to stop participating in the study, what should I do?

You are free to leave the study at any time. If you leave the study before it is finished, there will be no penalty to you, and you will not lose any benefits to which you may otherwise be entitled. If you choose to tell the researchers why you are leaving the study, your reasons for leaving may be kept as part of the study record. If you decide to leave the study before it is finished, please notify one of the persons listed in Section 10 "Contact Information" (below). Samples without identifiers might still be retained for research. When this study ends, samples will be stripped of information or codes that could identify you and the samples then stored for use in other studies in an anonymous fashion, or the samples may be properly disposed of.

7.2 Could there be any harm to me if I decide to leave the study before it is finished?

No

7.3 Could the researchers take me out of the study even if I want to continue to participate?

Yes. There are many reasons why the researchers may need to end your participation in the study. Some examples are:

- ✓ The researcher believes that it is not in your best interest to stay in the study.
- ✓ You become ineligible to participate.
- ✓ The study is suspended or canceled.

8. FINANCIAL INFORMATION

8.1 Will taking part in this study cost me anything? Will I or my insurance company be billed for any costs of the study? If so, which costs? What happens if my insurance does not cover these costs?

There are no costs or billing for this study.

8.2 Will I be paid or given anything for taking part in this study?

No. You will not be paid for taking part in this study.

8.3 Who could profit or financially benefit from the study results?

No person or organization has a financial interest in the outcome of this study.

9. CONFIDENTIALITY OF SUBJECT RECORDS AND AUTHORIZATION TO RELEASE YOUR PROTECTED HEALTH INFORMATION

The information below describes how your privacy and the confidentiality of your research records will be protected in this study.

9.1 How will the researchers protect my privacy?

Your blood sample will be coded and the code list securely stored and accessible only to members of the investigative team. If there is a medical reason to seek specific information from you in the future, your doctor will tell you about this. When results are shared with other scientists no names or other information which could be used to identify the participant will be shared.

9.2 What information about me could be seen by the researchers or by other people? Why? Who might see it?

Signing this form gives the researchers your permission to obtain, use, and share information about you for this study, and is required in order for you to take part in the study. Information about you may be obtained from any hospital, doctor, and other health care provider involved in your care, including:

- Hospital/doctor's office records, including test results (X-rays, blood tests, urine tests, etc.)
- Mental health care records (except psychotherapy notes not kept with your medical records)
- Alcohol/substance abuse treatment records
- Your AIDS/HIV status

Study No.: IRB: 2003-0906

Consent Approved On: 01/21/10

Project Approval Expires On: 01/20/11

- All records relating to your condition, the treatment you have received, and your response to the treatment
- Billing information

There are many reasons why information about you may be used or seen by the researchers or others during or after this study. Examples include:

- The researchers may need the information to make sure you can take part in the study.
- The researchers may need the information to check your test results or look for side effects.
- University, Food and Drug Administration (FDA), and/or other government officials may need the information to make sure that the study is done in a safe and proper manner.
- Study sponsors or funders, or safety monitors or committees, may need the information to:
 - Make sure the study is done safely and properly
 - Learn more about side effects
 - Analyze the results of the study
- Insurance companies or other organizations may need the information in order to pay your medical bills or other costs of your participation in the study.
- The researchers may need to use the information to create a databank of information about your condition or its treatment.
- Information about your study participation may be included in your regular UMHS medical record.
- Federal or State law may require the study team to give information to government agencies. For example, to prevent harm to you or others, or for public health reasons.

The results of this study could be published in an article, but would not include any information that would let others know who you are.

9.3 What happens to information about me after the study is over or if I cancel my permission?

As a rule, the researchers will not continue to use or disclose information about you, but will keep it secure until it is destroyed. Sometimes, it may be necessary for information about you to continue to be used or disclosed, even after you have canceled your permission or the study is over. Examples of reasons for this include:

- To avoid losing study results that have already included your information
- To provide limited information for research, education, or other activities (This information would not include your name, social security number, or anything else that could let others know who you are.)
- To help University and government officials make sure that the study was conducted properly

As long as your information is kept within the University of Michigan Health System, it is protected by the Health System's privacy policies. For more information about these policies, ask for a copy of the University of Michigan Notice of Privacy Practices. This information is also available on the web at <http://www.med.umich.edu/hipaa/npp.htm>. Note that once your information has been shared with others as described under Question 9.2, it may no longer be protected by the privacy regulations of the federal Health Insurance Portability and Accountability Act of 1996 (HIPAA).

9.4 When does my permission expire?

Your permission expires at the end of the study, unless you cancel it sooner. You may cancel your permission at any time by writing to the researchers listed in Section 10 "Contact Information" (below).

10. CONTACT INFORMATION

10.1 Who can I contact about this study?

Please contact the researchers listed below to:

- Obtain more information about the study
- Ask a question about the study procedures or treatments
- Report an illness, injury, or other problem (you may also need to tell your regular doctors)

Study No.: IRB: 2003-2906

Consent Approved On: 01/21/10

Project Approval Expires On: 01/20/11

- Leave the study before it is finished
- Express a concern about the study

Principal Investigator: Friedhelm Hildebrandt, MD
 University of Michigan Medical Center
 Department of Pediatrics and Communicable Diseases
 1150 W. Medical Center Drive
 MSRB III, Room 8220C
 Ann Arbor, MI 48109-5646
 e-mail: mutation@renalgenes.org

Study Coordinator
 University of Michigan Medical Center
 Department of Pediatrics and Communicable Diseases
 1150 W. Medical Center Drive
 MSRB III, Room 8220
 Ann Arbor, MI 48109-5646
 e-mail: mutation@renalgenes.org

You may also express a concern about a study by contacting the Institutional Review Board listed below, or by calling the University of Michigan Compliance Help Line at 1-888-296-2481.

University of Michigan Medical School Institutional Review Board (IRBMED)
 Argus I
 517 W. William
 Ann Arbor, MI 48103-4943
 Telephone: 734-763-4768
 Fax: 734-615-1622
 E-mail: irbmed@umich.edu

If you are concerned about a possible violation of your privacy, contact the University of Michigan Health System Privacy Officer at 1-888-296-2481.

When you call or write about a concern, please provide as much information as possible, including the name of the researcher, the IRBMED number (at the top of this form), and details about the problem. This will help University officials to look into your concern. When reporting a concern, you do not have to give your name unless you want to.

11. RECORD OF INFORMATION PROVIDED

11.1 What documents will be given to me?

Your signature in the next section means that you have received copies of all of the following documents:

- This "Consent to be Part of a Research Study" document. *(Note: In addition to the copy you receive, copies of this document will be stored in a separate confidential research file and may be entered into your regular University of Michigan medical record.)*
- Other (specify): _____

**The following should be completed by the study member conducting the assent process. If the child agrees to be in the study, check all that apply:*

- The child is capable of reading and understanding the assent form and has signed below as documentation of assent to take part in this study.
- The child is not capable of reading the assent form, but the information was verbally explained to him/her. The child signed below as documentation of assent to take part in this study.
- The child had ample opportunity to have his or her questions answered.

**I have read this form or someone has read it to me. If I did not understand something, I asked the doctor or the assistant to explain it to me. I can always ask the doctor or the assistant a question about the study if I don't understand something.*

12. SIGNATURES

Research Subject:

I understand the information printed on this form. I have discussed this study, its risks and potential benefits, and my other choices with _____ . My questions so far have been answered. I understand that if I have more questions or concerns about the study or my participation as a research subject, I may contact one of the people listed in Section 10 (above). I understand that I will receive a copy of this form at the time I sign it and later upon request. I understand that if my ability to consent for myself changes, either I or my legal representative may be asked to re-consent prior to my continued participation in this study.

Signature of Subject: _____ Date: _____

Name (Print legal name): _____

Patient ID: _____ Date of Birth: _____

If a **result** is obtained by the research:

Yes, I want to know the result _____ (Please initial)

No, I do NOT want to know the result _____ (Please initial)

Kidney Tissue:

Yes, kidney tissue has been obtained in the course of my disease and I agree that that tissue is used for further investigations. _____ (Please initial)

No, I do NOT want my tissue samples to be used in the course of this project. _____ (Please initial)

Future Specimen Use:

Yes, I agree to have my samples used in future related research projects on nephrotic syndrome or other genetic kidney diseases. _____ (Please initial)

No, I do NOT want to have my samples used in future related research projects on nephrotic syndrome or other genetic kidney diseases. _____ (Please initial)

Legal Representative (if applicable):

Signature of Person Legally

Authorized to Give Consent: _____ Date: _____

Name (Print legal name): _____ Phone: _____

Address: _____

Check Relationship to Subject:

Parent Spouse Child Sibling Legal Guardian Other: _____

If this consent is for a child who is a ward of the state (for example a foster child), please tell the study team immediately. The researchers may need to contact the IRBMED.

Reason subject is unable to sign for self: _____

Principal Investigator (or Designee):

I have given this research subject (or his/her legally authorized representative, if applicable) information about this study that I believe is accurate and complete. The subject has indicated that he or she understands the nature of the study and the risks and benefits of participating.

Name: _____ Title: _____

Signature: _____ Date of Signature: _____

Witness (optional):

I observed the above subject (or his/her legally authorized representative, if applicable) sign this consent document.

Name: _____ Title: _____

Signature: _____ Date of Signature: _____

EK 3. Türkçe Aydınlatılmış Onam Formu

IRBMED No.: 2003-0906

Consent Approved by IRBMED On: 01/21/10

IRBMED Project Approval Expires On: 01/20/11

MICHIGAN UNIVERSITESI BILIMSEL ARASTIRMAYA KATILIM IZNI

BU FORM HAKKINDA BILGI

Bir bilimsel araştırmada yer almaya uygun olabilirsiniz. Bu form size çalışma hakkında önemli bilgiler vermektedir. Bu form çalışmanın amacını, çalışmaya katılımın tehlike ve muhtemel yararlarını tanımlamaktadır.

Lütfen bu bilgiyi dikkatlice incelemek için zaman ayırın. Bitirdikten sonra çalışma hakkında araştırmacılarla konuşmanız ve sorularınızı sormanız gerekmektedir. Bu çalışmaya katılımınız hakkında diğerleriyle de (örneğin arkadaşlarınız, aileniz ya da diğer doktorlar) konuşabilirsiniz. Eğer bu çalışmada yer almaya karar vererseniz, sizden bu formu imzalamanız istenecek. Bu formu imzalamadan önce çalışmanın ne hakkında olduğunu, tehlikeleri ve size olası yararları anladığınızdan emin olun.

1. BU ÇALIŞMA VE ARASTIRICILAR HAKKINDA GENEL BILGI

1.1 Çalışmanın adı:

Glomeruler hastalığın neden olduğu nefrotik sendrom, proteinüri ve böbrek yetmezliğinin yeni genlerinin klonlanması

1.2 Çalışmanın sponsoru olan şirket ya da acenta:

NIH (National Institutes of Health) (Ulusal Sağlık Enstitüsü)

1.3 Çalışmayı yürüten araştırmacıların adları ve dereceleri:

| | |
|----------------------------|----------------------|
| Friedhelm Hildebrandt, MD | Esas Araştırmacı |
| Roger Wiggins, MD | Yardımcı Araştırmacı |
| Innis, Jeffrey, MD | Yardımcı Araştırmacı |
| Otto, Edgar, PhD | Yardımcı Araştırmacı |
| Airik, Rannar, PhD | Yardımcı Araştırmacı |
| Allen, Susan, MS | Yardımcı Araştırmacı |
| Ashraf, Shazia, MS | Yardımcı Araştırmacı |
| Chaib, Hassan, PhD | Yardımcı Araştırmacı |
| Chaki, Moumita, PhD | Yardımcı Araştırmacı |
| Chernin, Gil, MD | Yardımcı Araştırmacı |
| Ghosh, Amiya, PhD | Yardımcı Araştırmacı |
| Harville, Heather, BS | Yardımcı Araştırmacı |
| Heeringa, Saskia, MD | Yardımcı Araştırmacı |
| Held, Susanne, BS | Yardımcı Araştırmacı |
| Hinkes, Bernward, MD | Yardımcı Araştırmacı |
| Hurd, Toby, PhD | Yardımcı Araştırmacı |
| Janssen, Sabine, BS | Yardımcı Araştırmacı |
| O'Toole, John, MD | Yardımcı Araştırmacı |
| Ovunc, Bugu, MD | Yardımcı Araştırmacı |
| Natarajan, Sivakumar, MS | Yardımcı Araştırmacı |
| Ramaswami, Gokul, BS | Yardımcı Araştırmacı |
| Saisawat, Pawaree, MD | Yardımcı Araştırmacı |
| Schoeb, Dominik, BS | Yardımcı Araştırmacı |
| Vega-Warner, Virginia, PhD | Yardımcı Araştırmacı |
| Vlangos, Christopher, PhD | Yardımcı Araştırmacı |
| Zhou, Weibin, PhD | Yardımcı Araştırmacı |

IRBMED Consent Template Version: 6-19-03-a
DO NOT CHANGE THIS BOX--IRBMED USE ONLY

2. CALISMANIN AMACI

2.1 Calisma amaci:

Nefrotik sendrom (NS) en yaygin bobrek hastaliklarindan birisidir. Bu calismanin amaci nefrotik sendroma neden olabilecek genlerin tanimlanmasidir.

3. CALISMAYA KATILANLAR (DENEK) HAKKINDA BILGI

Bu calismada yer almak tamamen gonullu olmayi gerektirir. Istemiyorsaniz katilmak zorunda degilsiniz. Ayrica calismadan istediginiz zaman ayrilabilirsiniz. Eger calisma bitirilmeden once ayrilirsaniz, size ceza herhangi bir ceza uygulanmayacaktır ve daha once sahip oldugunuz haklari da kaybetmeyeceksiniz.

3.1 Calismaya kimler katilabilir?

Bir nefrolog tarafından saptanmis nefrotik sendromlu herhangi bir kisi ve bu bireylerin birinci derece yakinlari (ornegin kardesleri, cocuklari ya da ebeveynleri) bu calismaya katilmaya uygundur. Hasta bireylerin anne ve babasi arasinda uzak akrabalik varliginda (eger bunlar arasinda kan bagi varsa) bu bireyler calisma icin uygun olarak degerlendirilebilir.

Not: arastiricilara tibbi gecmisiniz ve durumunuzla ilgili tam ve dogru bilgi vermeniz cok onemlidir

3.2 Bu calismaya katilmasi beklenen kisi sayisi nedir?

Bu calisma icin yaklasik 2500 birey katilacaktır.

4. CALISMA PROSEDURLERI HAKKINDA BILGI

4.1 Bu calismada bana tam olarak ne yapilacak? Eger bu calismaya katilmaya karar verirsem ne tip arastirma prosedurleri uygulanacak?

Bu calismaya katilmak icin bu belgeyi doktorunuzla gozden gecirmeniz gerekmektedir. Eger bu calismada denek olmaya karar verirseniz, doktorunuz bize bobreginizden protein kaybi ve daha once yaptirmis oldugunuz laboratuvar testlerinin sonuclarindan bu calisma icin uygun olanlari hakkında bilgi verecektir. Eger ailenizin diger bireylerinde de ayni hastalik varsa, calismamizdan onlara da bahsetmenizi rica ediyoruz, biz size onlara vermeniz icin gerekli bilgiyi saglayacagiz. Ilgilenen uygun aile bireyleri size verecegimiz bir posta kartini bize gondererek onlarla irtibat kurmamiz icin izin verebilirler.

Son olarak standart kan testleri icin alindigi gibi ayni sekilde kolunuzun toplar damarindan kan ornegi alinacaktır. Alinacak toplam kan ornegi bir yetiskinden yaklasik 4 cay kasigi (20 ml), bir cocuktan 2 cay kasigi (10 ml) kadar olacaktır.

Daha sonra alinan ornegi nefrotik sendroma neden oldugu bilinen genlerdeki mutasyonlar acisindan arastiracagiz. Eger doktorunuzun belirledigi bir bobrek hastaliginiz varsa, nefrotik sendrom icin yapilan genetik testlerin sonuclarinin raporu isterseniz doktorunuza gonderilebilir. Sonuclar calismanin bir parcasidir, onaylanmis laboratuvar testinin degil. Sonuclar baska yonlerden saglikli olan katilimcilara gonderilemez. Alinan tum ornekler, katilimci calismadan ayrilmadikca saklanacaktır. Eger sizde bilinen genlerden birinde mutasyon yoksa, bu projenin bir parçasi olarak hastaliga neden olan yeni genlerin tanimlanmasi icin daha ileri calismalar yapacagiz. Bu tip arastirma yillarca surebilir, eger siz bu calismaya katildiktan sonra bobrek hastaligi ortaya cikarsa bu gelismeden arastiricilari bilgilendirmeniz istenir ve eger isterseniz genetik testlerinizin sonuclarini almaya uygun olabilirsiniz.

Hastalığınızın seyri sırasında bobrekleriniz alınırsa, doktorunuzdan örnek almak için sizden izin isteriz. Bu araştırma projesi nefrotik sendromun nedenlerini tanımlamak için tasarlanmıştır. Rutin doktor kontrolleriniz ve herhangi bir laboratuvar tetkikinizin bedeli bu çalışma tarafından finanse edilmez. Nefrotik sendromun nedenlerine dair yeni bilgiler olduğundan araştırma projesinde yeni fikirler ortaya çıkabilir. Bu nedenle ileride ilgili çalışmalar için örneklerinizi kullanıp kullanmama hakkında fikrinizi bu belgenin sonunda bize iletme şansınız olacaktır. Yeni çalışmalar bu çalışmada olduğu gibi aynı kesin etik kuralları takip edecektir.

4.2 Bu çalışmaya katılmam için zamanımın ne kadarı gerekecek? Çalışmada katılımlım ne zaman sonlanacak

Bu çalışmaya katılımda bu rıza formunu doldurmak ve kan vermek için tek bir ziyaret istenmektedir. Nadir durumlarda (örneğin alınan örneğin ilsem aşamasında sorun gibi) ilave kan örneği almak için ikinci bir ziyaret gerekebilir. Bu yaklaşık 1 saat olacaktır. Kan örneğinden elde edilen DNA nefrotik sendromun genetik nedenlerinin değerlendirilmesi için ancak özel kişilere acik olacak ve isim belirtilmeyecek şekilde saklanacaktır.

5. TEHLIKE VE YARARLAR HAKKINDA BILGI

5.1 Bu çalışmada yer alırsam hangi tehlikelerle karşılaşacağım? Bu tehlikelere karşı beni korumak için araştırmacılar ne yapacaklar?

Bilinen ya da beklenen tehlikeler:

Rutin venöz kan alınması sırasında görülebilecek olaylar; rahatsızlık, ağrı, baygınlık ya da sersemlik dahil.

Hastalığın genetik bir nedeninin tanımlanması sigorta edilmeyi güçleştirebilir ya da sigorta bedelini arttırabilir. Bununla beraber sigorta şirketleri genetik testleri, genetik test için kan alınmasını ya da kanın gönderilmesini karşılamadıkları için bu çalışmanın sonuçlarına da yetkili değildir. Araştırmacılar bu çalışmanın hiçbir sonucunu katılımcının özel doktoru hariç acığa vurmayacaklardır. Eğer katılımcı tarafından istenirse, araştırmacılar katılımcının özel doktoruna da sonuçları bildirmeyecektir.

Hastalığın genetik nedenini öğrenmek katılımcının ruhsal durumunu bozup anksiyete ve ya depresyona neden olabilir. Sadece bobrek hastalığı olduğunu bilen bireylere rapor ederek bu bilginin neden olacağı sıkıntının azaltılabileceğini umuyoruz, bu nedenle bu bilgi sadece kendinde bir bobrek hastalığı olduğunu bilen kişiler için kesin tanı sağlayacaktır.

Herhangi bir araştırmada olabileceği gibi bilinmeyen ya da beklenmeyen ilave tehlikeler olabilir. Kan, antiseptik teknik kullanılarak kontrollü bir çevrede alınacaktır. Bu çalışmadan elde edilecek hiçbir bilgi katılımcının özel doktorundan başka herhangi biriyle paylaşılmayacaktır.

Lütfen bu çalışmanın sonuçlarını almanın sizde oluşturacağı duygusal etkiyi göz önünde bulundurun. Bu çalışmaya katılımlığınız sonuçların doktorunuza bildirilmesini gerektirmez. Eğer bu çalışmanın sonuçlarını öğrenmenin potansiyel ayrıntılarını anlamazsanız, bu formu imzalamadan ve çalışmaya katılmadan önce bunları kendi doktorunuzla, bu çalışmanın araştırmacılarıyla ya da genetik danışma aldığınız kişilerle tartışmanızı öneririz. Bu çalışma genetik danışma maliyetlerini ya da sonuçları tartışmak veya gözden geçirmek için doktor vizite ücretlerini karşılamamaktadır.

5.2 Bu çalışmanın sonucunda yaralanırsam, hasta olursam ya da diğer problemlerim olursa ne olacak?

Araştırmacılar bilinen ya da beklenen riskleri azaltmak için gerekli tedbirleri almıştır. Bununla beraber sorun ya da yan etkilerle yine de karşılaşabilirsiniz. Eğer zarar görmüş olduğunuza inanırsanız, bu formun 10.bölümünde listelenen araştırmacıları haberdar edin. Michigan Üniversitesi ilk yardım ya da acil

servis hizmeti saglayacaktır. Bu ilk yardım ya da acil servis hizmetinin bedeli sigorta sirketiniz fatura edilebilir, fakat eger bu sizin sigorta sirketiniz tarafından karsilanmazsa, Michigan Universitesi odeyecektir. Eger universite ilave tibbi tedavi gerekliligini saptarsa bu da saglanacaktır. Bu formu imzalamakla, bu calismada olmanin bir sonucu olarak zarar gorurseniz tazminat hakkinizi aramanizdan feragat etmis olmazsiniz.

Lutfen dikkat: Bu calismada karsilasacaginiz yaralanma, yan etki ya da diger problemleri arastiricilara bildirmeniz onemlidir. Bununla birlikte kendi ozel doktorunuza da bildirebilirsiniz.

5.3 Bu calismada yer alirsam baska calismalara da katilabilir miyim?

Evet

5.4 Bu calismada yer alirsam bundan ne cikarim olabilir? Baskalarinin nasil faydalanabilir?

Bu calismada olmanizdan kisisel bir yarar saglayacaginiza soz veremeyiz, her ne kadar bazi insanlar genetik sorunlar ve bunlari tibbi sonuclari hakkında bilimsel bilgiye katkiyi tatminkar bulsa da. Diger insanlar gelecekte daha iyi tanisal ve tedavi edici prosedurlerden yararlanabilir.

5.5 Arastiricilar eger bu calismada kalip kalmama fikrimi degistirebilecek yeni bir bilgi ogrenirse bana bildirecek mi?

Evet, arastiricilar eger bu calismada kalma fikrinizi degistirebilecek yeni birsey ogrenirlerse size bildireceklerdir. Eger yeni bilgi siz calismaya katildiktan sonra elde edilirse, yeni bilgiyi iceren yeni bir riza formunu imzalamaniz istenebilir.

6. DIGER SECENEKLER

6.1 Eger bu calismada yer almamaya karar verirsem, diger seceneklerim nedir?

Eger bu calismaya katilmayi istemezseniz, size nefrotik sendrom icin genetik test yapmayi teklif edemeyiz.

7. CALISMANIN SONLANDIRILMASI

7.1 Eger calismaya katilimimi sonlandirmayi istersem ne yapmam gerekiyor?

Calismadan istediginiz zamanda ayrilmakta serbestsiniz. Eger calisma bitmeden ayrilirsaniz, size herhangi bir ceza uygulanmayacaktır ve daha once sahip oldugunuz haklarinizi da kaybetmeyeceksiniz. Eger arastiricilara calismadan neden ayrildiginizi anlatmayi secerseniz, calismadan ayrilma sebepleriniz calisma kaydi olarak saklanabilir. Eger calisma sonlanmadan ayrilmaya karar verirseniz, 10.bolumde siralanan kisilerden birini lutfen haberdar edin. Cunlu bu ornekler arastirma icin kullanilmaya devam edilebilir. Bu calisma bittiginide, ornekler uzerindesizi tanitacak bilgi ya da kod numaralari cikarilacak ve isimsiz sekilde baska calismalarda kullanilmak uzere saklanacaktır.

7.2 Eger calisma bitmeden ayrilmaya karar verirsem bunun bana zarari olabilir mi?

Hayir

7.3 Arastiricilar ben calismaya katilimimin devamini istesem bile beni calismadan cikarabilirler mi?

Evet. Arastiricilarin sizi calismadan cikarmalari icin bircok neden olabilir. Birkac ornek:

Katilima devam icin uygunsuz duruma gelmeniz.

Calismanin askiya alınmasi ya da iptali.

8. FINANSAL BILGI

8.1 Bu calismada yer almamin bana herhangi bir maliyeti olacak mi? Bana ya da sigorta sirketime calismani herhangi bir masrafi fature edilecek mi? Eger edilecekse hangi masraflar? Eger sigortam bu masraflari karsilamazsa ne olur?

Hayir. Kan alimi, arastiricilar tarafından istenilen laboratuvar testleri ya da orneklerin gonderilmesi masraflari icin herhangi bir ucret katilimciya ya da katilimcinin sigorta sirketine fatura edilmez, bu hatadir ve bu masraflari karsilayacak arastiricilarin dikkatine getirilmesi gerekir. Bununla beraber, arastirmanin sonucu ile genetik danisma, arastiricilar ve Michigan Universitesi tarafından karsilanmaz.

8.2 Bu calismada yer almak icin herhangi birsey verecek miyim ya da bana birsey odenecek mi?

Hayir

8.3 Bu calismanin sonucundan kim kar saglayacak ya da maddi yarar elde edecek?

Calismayi yoneten arastiricilar mi? Hayir.

Michigan Universitesi mi? Hayir.

9. KAYITLARIN GIZLILIGI VE GIZLI SAGLIK BILGILERINIZIN ACIGA CIKARILMASINA YETKI

Michigan Universitesi politikasi size ait gizli bilginin korunmasini gerektirir. Bu ozellile kisisel saglik bilgileriniz icin dogrudur.

Diger taraftan, bazen kanunlar bilgilerinizi baskalarinin gormesine musade eder ya da ister. Asagida verilen bilgi, bu calismada kayitlarnizin gizliliгинin nasil korunacagini anlatmaktadir.

9.1 Arastiricilar mahremiyeti nasil koruyacak?

Kan ornekleriniz kodlanacak ve kod listesi guvenli bir sekilde saklanacak ve sadece arastiricilarin girisine musait olacaktir. Eger gelecekte sizden ozel bir bilgiye ulamsak icin tibbi bir gereklilik olursa, doktorunuz bize bunu ifade edecektir. Sonuclar diger bilim adamlariyle paylasildigi zaman, sizi tanitabilecek hicbir isim ya da diger bilgi kullanilmayacaktır.

9.2 Benim hakkimda hangi bilgi arastiricilar ya da diger insanlar tarafından gorulebilir? Kim gorebilir?

Bu formu imzalayarak arastiricilara bu calisma icin sizin hakkinizdaki bilgileri elde etme, kullanma ve paylasma icin izin veriyorsunuz. Bu calismada yer almaniz icin bu formu imzalamaniz istenmektedir. Hakkinizdaki bilgi size saglik hizmeti vermis herhangi bir hastane, doktordan elde edilebilir.

Sizin hakkinizdaki bilgiler icerisinde calisma oncesi, sirasi ve sonrasindaki saglik durumunuz ve tibbi bakiminiz olabilir. Ornegin:

- Hastane ve doktor kayitlari, test sonuclari dahil (X-ray, kan ve idrar testleri gibi)
- Mental saglik kayitlari (psikoterapi notlari haric)
- Alkol/madde bagimlilik tedavi notlari
- AIDS/HIV durumu
- Durumunuzla ilgili tum kayitlar ve aldiginiz tedaviler ile tedaviye cevabiniz

Bilgilerinizin arastiricilar tarafından neden kullanilabilecegi ya da gorulebilecegine ilksin bircok neden var. Ornegin:

- Arastiricilar bu calismaya uygun oldugunuzdan emin olabilmek icin bilgiye gereksinim duyabilirler.
- Arastiricilar test sonuclarinizi kontrol etmek ya da yan etkileri arastirmak icin bilgiye gereksinim duyabilirler.
- Universite ya da hukumet yetkilileri calismanin dogru yapildigindan emin olmak icin bilgiye gereksinim duyabilirler.
- Calismanin sponsorlari calismanin dogru yapildigindan emin olmak icin bilgiye gereksinim duyabilirler.
- Bazi komiteler calismanin guvenli oldugundan emin olmak icin bilgiye gereksinim duyabilirler.
- Arastiricilar durumunuz ya da tedavi hakkında bilgi bankasi olusturmak icin bilgiye gereksinim duyabilirler.

Bu calismanin sonuclari bir makale seklinde yayinlanabilir ancak sizin kim oldugunuzu baskalarinin bilmesine olanak taniyacak bilgi icermeyecektir.

9.3 Calisma bittikten sonra ya da iznini iptal ederseniz hakkimdaki bilgiler ne olacak?

Kural olarak, arastiricilar hakkinizdaki bilgileri kullanmaya devam edemeyecekler ancak yok edilene dek gizli tutacaklardır. Bazen hakkinizdaki bilgilerin kullanilmaya devam edilmesi, calisma bitse veya izninizi iptal etseniz bile, gerekli olabilir. Bunun ornekleri:

- Sizin bilgilerinizi de iceren calisma sonuclarinin kaybolmasini onlemek icin
- Arastirma, egitim ya da diger aktiviteler icin sinirli bilgi saglamak icin (Bu bilgi adinizi ya da sizin hakkinizda baska birsey icermeyecektir)
- Universite ve hukumet yetkililerinin calismanin dogru yapildigina emin olmalarina yardimci olmak icin

Bilgileriniz Michigan Universitesi Saglik Sistemi icinde oldugu surece, universitenin politikasi gereginde koruma altinda olacaktır. Bu politikalar hakkında daha fazla bilgi edinmek icin <http://www.med.umich.edu/hipaa/npp.htm> internet sitesini ziyaret edebilirsiniz. Bilgilerinizin 9.2. soruda tanimlandigi sekilde baskalarinca paylasildiginda, universitenin mahremiyet politikalarinca daha fazla korunamayabilecegini biliniz.

9.4 Iznim ne zaman sona erer?

Izniniz, siz daha once iptal etmediginiz surece calismanin sonunda biter. Izninizi herhangi bir zamanda 10.bolumde belirtilen kisilere yazili olarak bildirerek iptal edebilirsiniz.

10. İRTIBAT

10.1 Bu calisma hakkında kiminle irtibat kurabilirim?

Asagida belirtilen tum arastiricilarla sunlar icin irtibat kurabilirsiniz:

- Calisma hakkında daha fazla bilgi almak
- Calisma metodlari ya da tedaviler hakkında soru sormak
- Bir hastalik ya da diger problemleri bildirmek (bunu ayrica kendi ozel doktorunuza da bildirmeniz gerekebilir)
- Calisma bitmeden calismadan ayrilmak
- Calisma hakkında duydugunuz bir endiseyi bildirmek

IRBMED No.: 2003-0606

Consent Approved by IRBMED On: 01/21/10

IRBMED Project Approval Expires On: 01/20/11

Temel Araştırmacı: Friedhelm Hildebrandt, MD
 Posta Adresi: University of Michigan Medical Center
 Department of Pediatrics and Communicable Diseases
 1150 W. Medical Center Drive
 MSRB III, Room 8220C
 Ann Arbor, MI 48109-5646, USA
 e-posta: mutation@renalgenes.org

Çalışmanın koordinatörü: Study Coordinator
 Posta Adresi: University of Michigan Medical Center
 Department of Pediatrics and Communicable Diseases
 1150 W. Medical Center Drive
 MSRB III, Room 8240
 Ann Arbor, MI 48109-5646, USA
 e-posta: mutation@renalgenes.org

Ayrıca çalışmaya hakkındaki endişelerinizi aşağıda bildirilen yerle irtibat kurarak ya da (888-296-2481) numaralı telefonla arayarak bildirebilirsiniz.

University of Michigan Medical School Institutional Review Board (IRBMED)
 Argus I
 517 W. William
 Ann Arbor, MI 48103-4943
 Telephone: 734-763-4768
 Fax: 734-615-1622
 e-posta: irbmed@umich.edu

Eğer mahremiyetinizin ihlal edildiğine dair bir endişeniz olursa Michigan Üniversitesi Sağlık Sistemi yetkilisiyle (888-296-2481) numaralı telefonla irtibat kurunuz.

Aradığınızda ya da yazılı olarak endişenizi bildirdiğinizde, araştırmacının adı, IRBMED numarası (bu formun üstündeki numara), ve probleminizin detayları dahil olmak üzere mümkün olduğunca detaylı bilgi veriniz. Bu bilgiler üniversite yetkililerine sorununuzu soruşturmada yardımcı olacaktır. Bir endişeyi iletirken, istemedikçe adınızı bildirmek zorunda değilsiniz.

11. VERİLEN BİLGİNİN KAYDI

11.1 Bana hangi belgeler verilecek?

Bir sonraki bölümdeki imzanızın aşağıdaki belgelerin tümünün birer kopyasını aldığınız anlamına gelmektedir:

- Bilimsel araştırmaya katılım rızası (bu form). (Not: Aldığınız kopyaya ilave olarak bu belgenin kopyaları ayrı ve gizli bir araştırma dosyasında saklanacaktır.)
- Diğer: _____

12. İMZALAR

Katılımcı

Bu form üzerinde yazılı olan bilgileri anladım. Bu çalışmanın detaylarını, risklerini ve potansiyel faydaları ile başka seçeneklerimi _____ ile tartıştim. Şimdiye kadar olan tüm sorumlularım cevaplandı. Çalışmaya katılımlım hakkında daha başka soru ya da merakım olursa 10.bölümde sıralanan kişilerle temas kurabileceğimi biliyorum. Bu formun bir kopyasının bana imzaladığım anda ya da istediğim herhangi bir zamanda verileceğini biliyorum. Kendim için karar verebilme yetisinde bir değişiklik olursa ya benden veya yasal temsilcilerimden bu çalışmaya katılımlımın devamından önce tekrar izin alınacağını biliyorum ve anladım.

Katılımcının imzası: _____ Tarih: _____
Ad-Soyad: _____

Eğer çalışmada birsey bulunursa

Evet, sonucu bilmek istiyorum _____ (Paraf)
Hayır, sonucu bilmek İSTEMİYORUM _____ (Paraf)

Bobrek dokusu:

Evet, bobrek biyopsisi hastalığımın seyri sırasında alınmıştı ve bu dokunun ileri araştırmalar için kullanılmasına izin veriyorum. _____ (Paraf)
 Hayır, doku örneklerimin bu projede kullanılmasını istemiyorum. _____ (Paraf)

İleride kullanma:

Evet, örneklerimin ileride nefrotik sendrom üzerine yapılacak diğer çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum. _____ (Paraf)
 Hayır, örneklerimin ileride nefrotik sendrom üzerine yapılacak diğer çalışmalarda kullanılmasına izin vermiyorum. _____ (Paraf)

Yasal Temsilci (varsa):

Yasal temsilcinin imzası: _____ Tarih: _____
Ad-Soyad: _____ Tel: _____
Adres: _____
Katılımcı ile ilişkisi (uygun olanı işaretleyiniz): _____
Ebeveyn Es Çocuk Kardes Diğer: _____

Araştırmacı:

Bu araştırma hakkında katılımcıya (varsa yasal temsilcisine) doğruluğu hakkında bilgi verilmiştir. Katılımcı çalışmanın içeriği ile katılımlımın risk ve yararları hakkında bilgilendirildiğini belirtmiştir.

Ad-Soyad: _____ Unvan: _____
İmza: _____ Tarih: _____

Sahit (varsa):

Yukarıda adı geçen katılımcının (ya da yasal temsilcisinin) bu rıza formunu imzaladığına şahidim.

Ad-Soyad: _____
İmza: _____ Tarih: _____

Mutation Analysis of *NPHS1* in a Worldwide Cohort of Congenital Nephrotic Syndrome Patients

Bugsu Ovunc^{a,d} Shazia Ashraf^a Virginia Vega-Warner^a Detlef Bockenhauer^a
Neveen A. Soliman Elshakhs^{f,g} Mark Joseph^c Friedhelm Hildebrandt^{a,b}
and Members of the Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie (GPN) Study Group¹

^aDepartment of Pediatrics and Department of Human Genetics, and ^bHoward Hughes Medical Institute, University of Michigan, Ann Arbor, Mich., and ^cPediatric Nephrology, Phoenix Children's Hospital, Phoenix, Ariz., USA;

^dDepartment of Medical Biology, Hacettepe University, Ankara, Turkey; ^ePediatric Nephrology, Great Ormond Street Hospital, London, UK; ^fCenter of Pediatric Nephrology and Transplantation, Cairo University, and

^gEgyptian Group for Orphan Renal Diseases (EGORD), Cairo, Egypt

Key Words

Mutation analysis · Congenital nephrotic syndrome · *NPHS1*

Abstract

Background: Congenital nephrotic syndrome (CNS) is defined as nephrotic syndrome that manifests within the first 3 months of life. Mutations in the *NPHS1* gene encoding nephrin, are a major cause for CNS. Currently, more than 173 different mutations of *NPHS1* have been published as causing CNS, affecting most exons. **Methods:** We performed mutation analysis of *NPHS1* in a worldwide cohort of 20 families (23 children) with CNS. All 29 exons of the *NPHS1* gene were examined using direct sequencing. New mutations were confirmed by demonstrating their absence in 96 healthy control individuals. **Results:** We detected disease-causing mutations in 9 of 20 families (45%). Seven of the families showed a homozygous mutation, while two were compound heterozygous. In another 2 families, single heterozy-

gous *NPHS1* mutations were detected. Out of 10 different mutations discovered, 3 were novel, consisting of 1 splice site mutation and 2 missense mutations. **Conclusion:** Our data demonstrate that the spectrum of *NPHS1* mutations is still expanding, involving new exons, in patients from a diverse ethnic background. Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

¹ A. Ezei (Buenos Aires, Argentina), A. Nayir (Istanbul, Turkey), C. Swerney (Ontario, Canada), D. Müller (Berlin, Germany), E. Evans (Birmingham, UK), E. Hodson (Sydney, N.S.W., Australia), E. Serdaroglu (Izmir, Turkey), J. Gellermann (Berlin, Germany), J. Kari (Jeddah, Saudi Arabia), J. Kozłowska (Warsaw, Poland), M. Albalwi (Riyadh, Saudi Arabia), M. Kemper (Hamburg, Germany), N. Gordjani (Offenbach, Germany), R. Beetz (Mainz, Germany), S. Alexander (Sydney, N.S.W., Australia), S. Hsieh (Phoenix, Ariz., USA), S. Kieselring (Lexington, Ky., USA), S. Nam-poothiri (Cochin, India).

KARGER

Fax: +41 61 306 12 34
E-Mail: karger@karger.ch
www.karger.com

© 2012 S. Karger AG, Basel
1660–2018/121200–01,395/000/0

Accessible online at:
www.karger.com/doc

Friedhelm Hildebrandt
University of Michigan Health System, 8220C MSRB III
1150 West Medical Center Drive
Ann Arbor, MI 48109-5646 (USA)
Tel.: +1 734 615 7280, E-Mail: hilde@umich.edu

Introduction

Congenital Nephrotic Syndrome

Congenital nephrotic syndrome (CNS) is defined as nephrotic syndrome manifesting by the 90th day of life. CNS of the Finnish type (CNF; MIM No. 256300) is a recessively inherited disorder first described in highly inbred Finnish communities [1, 2]. CNF is characterized by massive proteinuria at birth, a large placenta and marked edema occurring within the first 3 months of life [1, 3–5]. Renal histology shows mesangial hypercellularity and matrix expansion that progresses with age towards complete mesangial sclerosis and capillary obliteration [2]. Irregular microcystic dilatation of the proximal tubules is the most typical histologic feature, but is not observed in all cases [6–8]. Ultrastructural analysis of the glomerular capillary loops show complete foot process effacement and swelling of endothelial cells [9]. The course of the disease is progressive, leading to end-stage renal disease by 2–3 years of age.

NPHS1

By positional cloning, CNF was shown to be caused by mutations in *NPHS1* [10]. The *Fin_{major}* mutation (nt-121delCT, L41fsX91) and *Fin_{minor}* mutation (c.3325 C>T, R1109X) in the *NPHS1* gene were the first mutations to be discovered and the most prevalent mutations of CNF in the Finnish population (98% of cases) [10]. However, these mutations are also found in other ethnic groups [11, 12]. Screening for *NPHS1* mutations in patients of non-Finnish origin has shown that the frequency of *NPHS1* mutations is lower than that in Finnish patients, accounting for 39–50% of non-Finnish cases with CNS [13, 14]. On the other hand, rare cases with a manifestation beyond the age of 90 days have also been published, indicating that different mutations in *NPHS1* might cause a spectrum of clinical severity [15, 16]. To date, 173 different mutations in *NPHS1* have been described (<http://www.biobase-international.com>).

One striking finding among patients with CNS has been the detection of mutations in the *NPHS2* gene, encoding podocin, which has been implicated in early-onset steroid-resistant nephrotic syndrome [17]. *NPHS2* was shown to be mutated in almost 50% of cases with CNS who are of European origin [13]. In addition to the mutations in the *NPHS1* and *NPHS2* genes, further genetic heterogeneity has been demonstrated in CNS cases: *PLCE1* and *WT1* cause CNS and diffuse mesangial sclerosis (DMS) [18–21]. Mutations of *LAMB2* cause Pierson syndrome, as a part of a syndromic entity [22] with nephrotic syndrome

and microcoria, or as isolated nephrotic syndrome [23, 24]. Mitochondropathies in which the coenzyme Q10 biosynthesis pathway is disrupted may cause monogenic CNS along with neuromuscular symptoms as in mutations of the *COQ2* [25], *COQ6* [26] and *PDSS2* genes [27].

Nephrin

NPHS1 codes for the nephrin protein, an essential component of the interpodocyte-spanning slit diaphragm [28]. Nephrin is a transmembrane protein of the Ig superfamily characterized by eight C2-type Ig-like domains and a fibronectin type III-like module in the extracellular region, a single transmembrane domain and a cytosolic C-terminal end [10]. Mutations in *NPHS1* lead to disruption of the filtration barrier and cause massive protein loss. Nephrin plays a significant role in signaling between podocytes by interacting with CD2AP and podocin [29, 30].

Methods

Patient and Data Ascertainment

Within a worldwide cohort of children with nephrotic syndrome referred to us since May 2008 for mutational analysis, we selected all the patients who had nephrotic syndrome onset within the first 90 days of life. These were a total of 25 patients from 22 families.

Patients with mutations in the other genes known to cause CNS were excluded from the study. The frequency of mutations, clinical signs, renal and extra-renal signs, and the results of the renal biopsy make up the basis for the choice of genes to be tested. First, we performed mutation analysis for *NPHS2* and *WT1* for all 25 patients since these are the most frequent monogenic causes of childhood NS [13]. One patient (A3318 II-1) was found to have a homozygous mutation in *NPHS2* gene Ex2: c.353 C>T (H) (p.P118L) [31] and another patient (A3194 II-1) was revealed to have a novel heterozygous mutation in *WT1* gene Ex8: c.1097 G>A (h) (p.R366H). These two patients were excluded from the cohort. Additionally, screening for all 31 exons of *PLCE1* was performed in 2 patients (A3205 II-1 and A3360 II-1) with CNS because they revealed renal histology of DMS [18, 19]. However, none of these patients had a mutation in the *PLCE1* gene. There were no additional signs for other CNS causing genes to be tested in our cohort; therefore, we performed mutation analysis for *NPHS1* for the remaining 23 patients with CNS from 20 families.

Human subject research was approved by the University of Michigan Institutional Reviews Board and the Ethics Commission of the University of Freiburg, Germany. The diagnosis of CNS was made by pediatric nephrologists in specialized centers based on published criteria [32]. Following informed consent, detailed clinical and pedigree information was obtained by a standardized questionnaire available on www.renalgenes.org. Nephrotic range proteinuria was defined as proteinuria >40 mg/m²/h. When evaluating the frequency of mutations, we relate

them to families rather than patients because siblings have identical mutations. When evaluating clinical data, we relate them to patients because siblings might differ in their clinical phenotypes. It was shown in one of our previous studies that out of the two siblings with the homozygous missense mutation in *NPHS1* gene Ex14: c.1760 T>G (H) (p.L587R), only one developed nephrotic syndrome before the age of 90 days, while the other did not manifest until the age of 2 years [33].

Mutation Analysis

Genomic DNA was isolated from blood samples using the Puregene® DNA purification kit (Gentra, Minneapolis, Minn., USA) following the manufacturer's guidelines. Mutation analysis by direct exon sequencing was performed using exon-flanking primers and by direct sequencing of all the exons for *NPHS1*, *NPHS2*, *PLCE1* and *PAX2*. *WT1* analysis was limited to exons 8 and 9 since mutations of this gene that account for isolated NS has almost exclusively been reported in these two exons [21, 34]. Exon primers for *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1* and *PLCE1* have been published previously [14, 19, 21, 34, 35]. For sequence analysis the software SEQUENCHER 3.8™ (Gene Codes, Ann Arbor, Mich., USA) was used. The published reference sequence of *NPHS1* (NM_004646) was used as the relevant wild-type gene sequence. Sequencing of both DNA strands was performed for all detected mutations and other sequence variants. If parental samples were available, segregation of the variants was confirmed by direct sequencing of parental samples. For each novel mutation, its absence was demonstrated in 96 healthy control individuals of matched ethnic origin by direct sequencing. We here define 'disease-causing mutations' as the presence of both alleles of a recessive-disease gene (*NPHS1* or *NPHS2*) and one allele of a dominant disease gene (*WT1*) that are absent from 96 healthy control individuals and from the '1,000 genomes' database www.1000genomes.org.

Results

Patient Characteristics of the CNS Cohort

In this study, a worldwide cohort of 23 patients from 20 families with CNS was included. All patients were examined for *NPHS1* mutations. Families were from the following ethnicities: 7 Caucasian, 2 Turkish, 4 Arabic, 3 Indian, 2 Pakistan, 1 Vietnamese and 1 Hispanic. Eight patients from 8 families were from consanguineous parents. Renal biopsy was performed in 7 of them and showed CNF (3 patients), DMS (2 patients), glomerular mesangial proliferation (1 patient) and mesangioproliferative glomerulonephritis (1 patient). Because traditionally CNS is considered treatment refractory, 18 patients (78%) did not receive any therapy. In 3 patients (13%) steroid therapy was administered: 2 of them (A3319 II-1 and A3358 II-1) did not respond to the steroid therapy (steroid-resistant nephrotic syndrome). A3358 II-1 was then started on CPA and CsA therapy. The third patient (A3449 II-1) died 24 h after the administration of steroid therapy so no data

on the response was available. One patient (A3360 II-1) was partially responsive to cyclosporine A (CsA). One patient (A3325 II-1) was on antiproteinuric therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitors.

NPHS1 Mutations

Mutation analysis by direct exon sequencing of all 29 exons of *NPHS1* was performed for a total of 23 patients from 20 families. Both causative *NPHS1* mutations were detected in 9 of the 20 families (45%; table 1); therefore, the CNS phenotype is fully explained. *NPHS1* mutations represent a recessive single-gene cause of CNS. Recessive single-gene disease causes convey full penetrance of a disease. They are thus distinct from genetic variants that are found only to be associated with disease because associated variants usually explain only a low percentage of the phenotypic variance, as are the cases for instance in the *MYH9/APOLI* [36] and *HLA* [37–42] variants that have been found in nephrotic syndrome.

Nine families had disease-causing mutations in *NPHS1*. The affected individuals of 7 families were harboring the mutation homozygously (table 1). In these, we discovered one novel homozygous splice site mutation (IVS 7 + 1 G>T) in family A3236 (fig. 1). The affected individuals of 2 families (A3322 and A3326) were found to have compound heterozygous mutations (table 1). Family A3322 is compound heterozygous for a novel mutation in Ex22: c.2930 A>G (p.Y977C) along with the known mutation Ex27: c.3478 C>T (p.R1160X) [11] (fig. 1). p.Y977C is conserved down to *Danio rerio* with PolyPhen1 [43] and PolyPhen2 [44] scores that are classified to be 'probably damaging' (online suppl. table 1, www.karger.com/doi/10.1159/000337379).

Two patients from 2 families were found to have a single heterozygous mutation only (A3237 and A3319). One of these families (A3237) was carrying a novel single heterozygous mutation in Ex6: c.644 T>G (p.L215R) (fig. 1). p.L215R is conserved down to *Caenorhabditis elegans* with PolyPhen1 [43] and PolyPhen2 [44] scores that are classified to be 'probably damaging' (online suppl. table 1). Therefore, we speculate that our exon sequencing may have missed the second recessive mutation, e.g. a deletion or duplication or intronic mutations or mutations in the promotor region.

Overall, we discovered 10 different mutations, 3 of them novel, consisting of 1 splice site mutation (IVS 7 + 1 G>T) and 2 missense mutations (p.Y977C and p.L215R). We thereby extended the current *NPHS1* mutation spectrum of 173 mutations (<http://www.biobase-international.com>) by 3 novel mutations.

Table 1. Clinical and mutation information for 11 families with NPHS1 mutations detected

| Patient No. | Origin | Known consen- of gainity onset | Age | Gender | Renal biopsy | Treatment | Other clinical features | NPHS1 mutation* (exon; nucleotide change; amino-acid change) | Origin of mutation | Initial phenotype | |
|---|----------------------|--------------------------------|----------|--------|------------------------------------|--------------------------------|---|---|--|-------------------|-------------------|
| Homozygous mutations | | | | | | | | | | | |
| A3205 II-1 | Caucasian | no | 53 days | M | DMS | no treatment | none | EX18: c.2491 C>T; p.R831C | Leikkari et al. [11] 1999 | North America | CNS |
| A3235 II-3 | Arabic | yes | 2 months | F | not done | no treatment | none | EX2: c.3478 C>T; p.R1160X | Leikkari et al. [11] 1999 | Italy | Finnish type |
| A3236 II-1 | Indian sub-continent | yes | 1 month | F | not done | conservative treatment | none | IWS 7+1 G>T; splice error^b | this study | | Finnish type |
| A3325 II-1 | Pakistani | yes | 2 months | M | not done | diabetes, infusions, isotoprol | grand mal seizures, brother 4 years normal | EX6: c.614-621delinsTT; p.L205;P206;R207>L205 | Leikkari et al. [11] 1999 | Turkey | CNS, Finnish type |
| A3337 II-3 | Arabic | yes | 1 month | F | not done | no treatment | edema at birth, low set ears, depressed nasal bridge, high arched palate; two deceased brothers (sample not available) premature (34 weeks) | EX2: c.3478 C>T; p.R1160X | Leikkari et al. [11] 1999 | Italy | CNS, Finnish type |
| A3416 II-1 | Indian sub-continent | yes | 13 days | M | not done | no treatment | microcephaly, aminociduria, 3+ glycosuria and acidosis suggesting proximal tubular defect; died at 6 months of age, his older sister died at age 3.5 years; mother had oligohydramnios during pregnancy | EX2: c.3478 C>T; p.R1160X | Leikkari et al. [11] 1999 | Italy | CNS, Finnish type |
| A3442 II-2 | Indian sub-continent | no | 1 month | M | CNF | NID | | EX8: c.1069 C>T; p.R367C | Leikkari et al. [11] 1999 | France | CNS, Finnish type |
| Compound heterozygous variations | | | | | | | | | | | |
| A3322 II-2 | Caucasian | no | no data | M | not done | no treatment | degrees of proteinuria, not frank NS, hypodysplasia, hypertension, acidosis | EX22: c.2930 A>G; p.Y977C EX27: c.3478 C>T; p.R1160X | this study Leikkari et al. [11] 1999 | Italy | CNS, Finnish type |
| A3322 II-3 | Caucasian | no | no data | F | not done | no treatment | degrees of proteinuria, not frank NS | EX22: c.2930 A>G; p.Y977C EX27: c.3478 C>T; p.R1160X | this study Leikkari et al. [11] 1999 | Italy | CNS, Finnish type |
| A3322 II-4 | Caucasian | no | no data | F | not done | no treatment | degrees of proteinuria, not frank NS | EX22: c.2930 A>G; p.Y977C EX27: c.3478 C>T; p.R1160X | this study Leikkari et al. [11] 1999 | Italy | CNS, Finnish type |
| A3322 II-5 | Caucasian | no | no data | M | not done | no treatment | degrees of proteinuria, not frank NS | EX22: c.2930 A>G; p.Y977C EX27: c.3478 C>T; p.R1160X | this study Leikkari et al. [11] 1999 | Italy | CNS, Finnish type |
| A3326 II-1 | Hispanic | no | 1 month | F | CNF | no treatment | unilateral nephrectomy (1/2009) with normal renal function afterwards, left inguinal hernia | EX2: c.1394delG; p.E465K127 | Boerrega et al. [14] 2008 | Hispanic | Finnish type |
| Single heterozygous variations | | | | | | | | | | | |
| A3237 II-1 | Caucasian | no | | M | not done | NID | CNS, burn proctera (33+5), unexplained cardiorespiratory arrest day 5 | EX6: c.644 T>G; p.L215R | this study | | CNS, Finnish type |
| A3319 II-1 ^d | Turkish | no | | F | glomerular mesangial proliferation | SRNS | none | Ex 15: c.2044 G>A; p.A672T | Machasa et al. [50] 2010 | France | CNS, Finnish type |

CSA = Cyclosporin A; Ex = exon; FSGS = focal segmental glomerulosclerosis; MCPN = mesangial proliferative glomerulonephritis; ND = no data; NS = nephrotic syndrome; SRNS = steroid-resistant nephrotic syndrome; SSNS = steroid-sensitive nephrotic syndrome. * All novel mutations were absent from 98 Turkish control individuals and from the 1080 genomes project (<http://www.1000genomes.org>). Novel mutations are printed in bold. Novel missense mutations were conserved through evolution at least down to *Danio rerio*. RefSeq NM_004646 was used as relevant wild-type gene sequence for human NPHS1. ^b The novel mutation is shown to be segregating from mother and father. ^c The novel mutation is shown to be segregating from father and the known mutation from mother. ^d A3319 II-1 also has a single heterozygous mutation in NPHS2 Ex5: c.739G>C; p.E274Q.

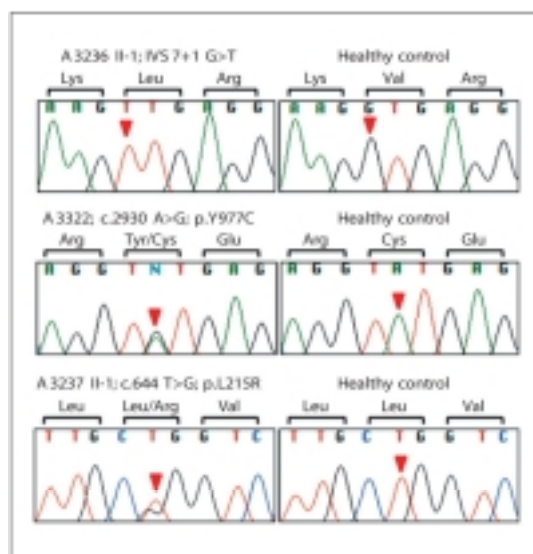


Fig. 1. Novel *NPHS1* mutations found in this study. One novel homozygous splice site mutation was found in *NPHS1* (IVS 7 + 1 G>T) in patient A3236 II-1. Additionally, two novel heterozygous mutations, Ex2: c.2930 A>G; p.Y977C and Ex6: c.644 T>G; p.L215R, were detected in family A3322 (all affected) and A3237 II-1, respectively. For each mutation, sequence from the patient and a healthy control individual is shown.

Discussion

In this study, we were able to define the disease-causing mutation in both alleles of *NPHS1* in 9 of 20 families and in one allele only in 2 families. Three mutations were novel.

Biopsies were performed in 4 cases out of 11 CNS families in whom we detected a mutation in the *NPHS1* gene. The results were CNF (2 patients), DMS (1 patient) and glomerular mesangial proliferation (1 patient). These data confirm the previous findings that *NPHS1* mutations can cause a somewhat broader variety of histological phenotypes other than CNF [13, 14, 33].

Although CNF is classically known to be steroid resistant, several cases of steroid-sensitive patients with *NPHS1* mutations have been reported previously [14, 45]. In our CNS cohort of patients, A3319 II-1, who carries the *NPHS1* mutation in one allele only, was given steroid therapy. This individual had no response to therapy. Another finding was that patient A3325 II-1, who had a ho-

mozygous insertion-deletion in *NPHS1*, was clinically stable on lisinopril only. Previously, 1 patient compound heterozygous for *Fin_{minor}* and a missense mutation was shown to respond to enalapril [46]. In another study, patients with homozygous missense mutations or patients with compound heterozygosity for a missense mutation and a frameshift mutation (or a small homozygous deletion causing a nonframeshift mutation) were shown to have a partial response to antiproteinuric therapy rarely [33].

We previously reported a CNS case of Hispanic origin (A1893) explained by the mutations in *NPHS1* gene Ex2: c.139delG (h) (p.E46fsX127) and c.3482-2 A>G (h) (splice site) [14]. In the current study, we found the same mutation (p.E46fsX127), but this time in compound heterozygosity with Ex13: c.1701 C>A (h) (p.C567X) [47] in patient A3326 II-1, who was also of Hispanic origin. A3326 II-1 was biopsied and proven as CNF and underwent unilateral nephrectomy. The patient had normal renal function of his unilateral kidney afterwards. A previous study showed that CNS management with captopril and indomethacin therapy in combination with unilateral nephrectomy achieves significant improvements in plasma albumin and reduces the need for albumin infusions and time in hospital; therefore, second nephrectomy, dialysis and transplantation can be delayed until the 3rd year of life or longer [48].

Another finding in this study was that family A3416 from the Indian subcontinent was found to have the mutation p.R1160X. In a previous study, p.R1160X was shown to be suggestive of a founder effect and therefore commonly known as the 'Maltese mutation' [11]. This mutation was also detected in CNF cases of Indian/Bangladesh origin, but associated with a different allele [11]. In the same study, p.R1160X resulted in an unexpectedly mild CNF phenotype in about half of the cases [11]. In our study at least a part of the patients with this mutation have a very early onset of CNS (13 days, 1 month and 2 months, respectively).

The classical notion that *NPHS1* mutations are seen in nephrotic syndrome cases with age of onset in the first 90 days of life was changed by the recent discovery that *NPHS1* mutations may cause onset beyond the first 3 months [15]. Previously, it was demonstrated that homozygosity mapping is a useful tool for screening for homozygous disease causing mutations in *NPHS1* [33, 49]. In our study, we also screened 9 families for *NPHS1* mutations (A3113, A3191, A3310, A3317, A3321, A3323 (2 sibs), A3327, A3329, A3377) that had the onset of NS symptoms beyond 90 days of life with single nucleotide polymor-

phism arrays (Gene Chip®) from Affymetrix, Inc. with a resolution of 250K (Human Mapping 250K *Styl* Array). The method has been described in detail previously [33, 49]. However, none of these families were found to have a disease-causing mutation in the *NPHS1* gene by direct sequencing (data not shown).

In previous studies, it was shown that approximately one half of CNS cases are caused by recessive mutations in *NPHS1* [13, 14, 33]. The *NPHS1* mutation rate in our cohort was 45%, accordingly.

Of the mutations described in this study, R1160X was the most frequent. This mutation was found homozygously in 3 families and was found in a compound heterozygous state with the novel mutation Y977C in one family with 4 affected siblings (A3322), accounting for 7 of 40 alleles (17.5%).

Regarding the families in which we did not detect disease-causing mutations in *NPHS1*, *NPHS2*, *PLCE1* or *WT1*, we cannot exclude mutations in regulatory elements or introns or heterozygous whole exon deletion as

the missing allele since we used an exon sequencing approach that might not detect these mutations. We speculate that mutations affecting other essential slit diaphragm proteins or interaction partners of nephrin may cause the disease in these patients.

Acknowledgements

We thank the patients and their physicians for contribution of blood samples and clinical data. This work was supported by grants to F.H. from the National Institutes of Health (DK076683, RC1-DK086542), from the NephCure Foundation and from the Thrasher Research Fund. F.H. is a Doris Duke Distinguished Clinical Scientist, the Frederick G. L. Huetwell Professor for the Cure and Prevention of Birth Defects and an investigator for the Howard Hughes Medical Institute.

Disclosure Statement

The authors have no financial interests to disclose.

References

- Norio R: Heredity in the congenital nephrotic syndrome. A genetic study of 57 Finnish families with a review of reported cases. *Ann Paediatr Fenn* 1966;27(suppl):21-94.
- Huttunen NP: Congenital nephrotic syndrome of Finnish type. Study of 75 patients. *Arch Dis Child* 1976;51:344-348.
- Ahvenainen EK, Hallman N, Hjelt L: Nephrotic syndrome in newborn and young infants. *Ann Paediatr Fenn* 1956;2:227-241.
- Hallman N, Hjelt L: Congenital nephrotic syndrome. *J Pediatr* 1959;55:152-162.
- Worthen HG, Vernier RL, Good RA: Infantile nephrosis: clinical, biochemical, and morphologic studies of the syndrome. *AMA J Dis Child* 1959;98:731-748.
- Huttunen NP, Rapola J, Viiska J, Hallman N: Renal pathology in congenital nephrotic syndrome of Finnish type: a quantitative light microscopic study on 50 patients. *Int J Pediatr Nephrol* 1980;1:10-16.
- Rapola J: Renal pathology of fetal congenital nephrosis. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1981;89:63-64.
- Rapola J, Sariola H, Ekblom P: Pathology of fetal congenital nephrosis: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Kidney Int* 1984;25:701-707.
- Kaukinen A, Ruusimäki AM, Lautenschlager I, Jalanko H: Glomerular endothelium in kidneys with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1). *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:1224-1232.
- Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kahtan CE, Peltonen L, Holsberg C, Olsen A, Tryggvason K: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein - nephrin - is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998;1:575-582.
- Lenkkeri U, Männikkö M, McCready P, Lamerdin J, Gribouval O, Niaudet PM, Antignac C, Kahtan CE, Holsberg C, Olsen A, Kestilä M, Tryggvason K: Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet* 1999;64:51-61.
- Fuchshuber A, Niaudet P, Gribouval O, Jean G, Gubler MC, Brojer M, Antignac C: Congenital nephrotic syndrome of the Finnish type: linkage to the locus in a non-Finnish population. *Pediatr Nephrol* 1996;10:135-138.
- Hinkes BG, Mucha B, Vlangos CN, Gbadegesin R, Liu J, Hasselbacher K, Hangan D, Ozaltin F, Zenker M, Hildebrandt F, Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie Study Group: Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMR2). *Pediatrics* 2007;119:e907-e919.
- Hoeringa SE, Vlangos CN, Chernin G, Hinkes B, Gbadegesin R, Liu J, Hoskins BE, Ozaltin F, Hildebrandt F, Members of the APN Study Group: Thirteen novel NPHS1 mutations in a large cohort of children with congenital nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:3527-3533.
- Philippe A, Nevo E, Esquivel EL, Reklaityte D, Gribouval O, Tête MJ, Loirat C, Dantal J, Fischbach M, Postel-Noble C, Decramer S, Hoehne M, Benzing T, Charbit M, Niaudet P, Antignac C: Nephrin mutations can cause childhood-onset steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:1871-1878.
- Liu L, Doné SC, Khoshnoodi J, Bertorello A, Wartiovaara J, Berggren PO, Tryggvason K: Defective nephrin trafficking caused by missense mutations in the NPHS1 gene: insight into the mechanisms of congenital nephrotic syndrome. *Hum Mol Genet* 2001;10:2637-2644.
- Bozte N, Gribouval O, Roselli S, Benassy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C: NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000;24:349-354.

- ▶ 18 Gbadegesin R, Hinkes BG, Hoskins BE, Vlangos CN, Heeringa SF, Liu J, Lohrat C, Ozaltin F, Hashmi S, Ulmer F, Cleper R, Ettinger R, Antignac C, Wiggins RC, Zenker M, Hildebrandt F: Mutations in *PLCE1* are a major cause of isolated diffuse mesangial sclerosis (IDMS). *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:1291-1297.
- ▶ 19 Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, Vlangos CN, Seelow D, Nürnberg G, Garg P, Verma R, Chaib H, Hoskins BE, Ashraf S, Becker C, Hennies HC, Goyal M, Wharram BL, Schachter AD, Mudamana S, Drummond I, Kerjaschi D, Waldherr R, Dietrich A, Ozaltin F, Bakaloglu A, Cleper R, Basel-Vanagite L, Pohl M, Griebel M, Tsygin AN, Soyba A, Müller D, Sorfi CS, Bunney TD, Katan M, Liu J, Attanasio M, O'Toole JF, Hasselbacher K, Mucha B, Otto EA, Airik B, Kispert A, Kelley GG, Sznarka AV, Gudermann T, Holzman LB, Nürnberg P, Hildebrandt F: Positional cloning uncovers mutations in *PLCE1* responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet* 2006;38:1397-1405.
- ▶ 20 Jeanpierre C, Denamur E, Henry I, Cahanis MO, Luce S, Cécille A, Elion J, Peuchmaur M, Lohrat C, Naudet P, Gubler MC, Junien C: Identification of constitutional *WT1* mutations, in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database. *Am J Hum Genet* 1998;62:824-833.
- ▶ 21 Mucha B, Ozaltin F, Hinkes BG, Hasselbacher K, Ruf RG, Schultheiss M, Hangan D, Hoskins BE, Everding AS, Bogdanovic R, Seeman T, Hoppe B, Hildebrandt F, Members of the APN Study Group: Mutations in the *Wilms' tumor 1* gene cause isolated steroid resistant nephrotic syndrome and occur in exons 8 and 9. *Pediatr Res* 2006;59:325-331.
- ▶ 22 Zenker M, Aigner T, Wendler O, Tralau T, Müntefering H, Fenski R, Pitz S, Schumacher V, Royer-Pokora B, Wühl E, Cochat P, Bouvier R, Kraus C, Mark K, Madlon H, Dätsch J, Rascher W, Marunjak-Chadek I, Lennert T, Neumann LM, Reis A: Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet* 2004;13:2625-2632.
- ▶ 23 Hasselbacher K, Wiggins RC, Matejas V, Hinkes BG, Mucha B, Hoskins BE, Ozaltin F, Nürnberg G, Becker C, Hangan D, Pohl M, Kuwertz-Bröking E, Griebel M, Schumacher V, Royer-Pokora B, Bakaloglu A, Nürnberg P, Zenker M, Hildebrandt F: Recessive missense mutations in *LAMB2* expand the clinical spectrum of LAMB2-associated disorders. *Kidney Int* 2006;70:1008-1012.
- ▶ 24 Choi HI, Lee BH, Kang IH, Jeong HJ, Moon KC, Ha IS, Yu YS, Matejas V, Zenker M, Choi Y, Cheong HI: Variable phenotype of Pierson syndrome. *Pediatr Nephrol* 2008;23:995-1000.
- ▶ 25 Diomedè-Carnassei F, Di Giandomenico S, Santorelli FM, Caridi G, Piemonte F, Montini G, Ghiggeri GM, Murer L, Barisoni L, Pastore A, Muda AO, Valente ML, Bertini E, Emma F: COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2773-2780.
- ▶ 26 Heeringa SF, Chernin G, Chaki M, Zhou W, Sloan AJ, Ji Z, Xie LX, Salviati L, Hurd TW, Vega-Warner V, Killen PD, Raphael Y, Ashraf S, Övunc B, Schoeb DS, McLaughlin HM, Airik B, Vlangos CN, Gbadegesin R, Hinkes B, Saisawat P, Trevisson E, Doimo M, Casarin A, Pertegato V, Gioegi G, Prokisch H, Röttig A, Nürnberg G, Becker C, Wang S, Ozaltin F, Topaloglu R, Bakaloglu A, Bakaloglu SA, Müller D, Beissert A, Mir S, Bendali A, Varpizom S, Zenker M, Matejas V, Santos-Ocaña C, Navas P, Kusakabe T, Kispert A, Akman S, Soliman NA, Krick S, Mündel P, Reiser J, Nürnberg P, Clarke CF, Wiggins RC, Faul C, Hildebrandt F: COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *J Clin Invest* 2011; 121:2013-2024.
- ▶ 27 López LC, Schuelke M, Quintill CM, Kanki T, Rodenburg RJ, Naini A, Dimauro S, Hirano M: Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet* 2006;79:1125-1129.
- ▶ 28 Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kostila M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K: Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7962-7967.
- ▶ 29 Shih NY, Li J, Karptikov V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner JH, Shaw AS: Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999;286:312-315.
- ▶ 30 Khoshnoodi J, Sigmundsson K, Ofverstedt LG, Skoglund U, Öbrink B, Wartiovaara J, Tryggvason K: Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions. *Am J Pathol* 2003;163:2337-2346.
- ▶ 31 Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, Morinère V, Tête MJ, Legendre C, Naudet P, Antignac C: NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int* 2004;66:571-579.
- ▶ 32 Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie: Short versus standard prednisone therapy for initial treatment of idiopathic nephrotic syndrome in children. *Lancet* 1988; i:380-383.
- ▶ 33 Schoeb DS, Chernin G, Heeringa SF, Matejas V, Held S, Vega-Warner V, Bockenhauser D, Vlangos CN, Moorani KN, Neuhaus TJ, Kari JA, Macdonald J, Saisawat P, Ashraf S, Övunc B, Zenker M, Hildebrandt F, Members of the Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie (GPN) Study Group: Nineteen novel NPHS1 mutations in a worldwide cohort of patients with congenital nephrotic syndrome (CNS). *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:2970-2978.
- ▶ 34 Ruf RG, Schultheiss M, Lichtenberger A, Karle SM, Zaleski I, Mucha B, Everding AS, Neuhaus T, Patzer I, Plank C, Haas JP, Ozaltin F, Imm A, Fuchshuber A, Bakaloglu A, Hildebrandt F, APN Study Group: Prevalence of *WT1* mutations in a large cohort of patients with steroid-resistant and steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2004;66:564-570.
- ▶ 35 Ruf RG, Lichtenberger A, Karle SM, Haas JP, Anacleto FE, Schultheiss M, Zaleski I, Imm A, Ruf EM, Mucha B, Bagga A, Neuhaus T, Fuchshuber A, Bakaloglu A, Hildebrandt F, Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie Study Group: Patients with mutations in *NPHS2* (*podocin*) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:722-732.
- ▶ 36 Genovese G, Tonna SJ, Knob AU, Appel GB, Katz A, Bernhardt AJ, Needham AW, Lazarus R, Pollak MR: A risk allele for focal segmental glomerulosclerosis in African Americans is located within a region containing *APOL1* and *MYH9*. *Kidney Int* 2010;78:698-704.
- ▶ 37 Kobayashi T, Ogawa A, Takahashi K, Uchiyama M: HLA-DQB1 allele associates with idiopathic nephrotic syndrome in Japanese children. *Acta Paediatr Jpn* 1995;37:293-296.
- ▶ 38 Haeflner A, Abbal M, Mytilineos J, Konrad M, Krammer I, Bouissou F, Opelz G, Schärer K, Cambon-Thomsen A: Oligotyping for HLA-DQA, -DQB, and -DPB in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1997; 11:291-295.
- ▶ 39 Bakr AM, El-Chenawy F: HLA-DQB1 and DRB1 alleles in Egyptian children with steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1998;12:254-257.
- ▶ 40 Bakr AM, El-Chenawy F, Al-Husseni F: HLA alleles in frequently relapsing steroid-dependent and -resistant nephrotic syndrome in Egyptian children. *Pediatr Nephrol* 2005;20: 159-162.
- ▶ 41 Krasowska-Kwieceń A, Sancewicz-Pach K, Moczulska A: Idiopathic nephrotic syndrome in Polish children - its variants and associations with HLA. *Pediatr Nephrol* 2006;21:1837-1846.
- ▶ 42 Huang YY, Lin FJ, Fu LS, Lan JL: HLA-DR, -DQB typing of steroid-sensitive idiopathic nephrotic syndrome children in Taiwan. *Nephron Clin Pract* 2009;112:c57-c64.

- 43 PolyPhen1: Prediction of functional effect of human nsSNPs. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph1/>.
- 44 PolyPhen2: Prediction of functional effect of human nsSNPs. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.
- ▶45 Kitamura A, Tsukaguchi H, Hiramoto R, Shono A, Doi T, Kagami S, Iijima K: A familial childhood-onset relapsing nephritic syndrome. *Kidney Int* 2007;71:946–951.
- ▶46 Patrakka J, Kestilä M, Wartiovaara J, Ruotsalainen V, Tisari P, Lenkkeri U, Miettinen M, Visapää J, Holmberg C, Rapola J, Tryggvason K, Jalanko H: Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): features resulting from different mutations in Finnish patients. *Kidney Int* 2000;58:972–980.
- ▶47 Belcheva O, Martin F, Lenkkeri U, Tryggvason K: Mutation spectrum in the nephrin gene (NPHS1) in congenital nephrotic syndrome. *Hum Mutat* 2001;17:368–373.
- ▶48 Kovacevic L, Reid CL, Rigden SP: Management of congenital nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2003;54:26–430.
- ▶49 Hildebrandt F, Heeringa SF, Rischendorf F, Attanasio M, Nürnberg G, Becker C, Seelow D, Huebner N, Chernin G, Vlangos CN, Zhou W, O'Toole JF, Hoskins BE, Wolf MT, Hinkes BG, Chab H, Ashraf S, Schoeb DS, Ovunc B, Allen SJ, Vega-Warner V, Wise E, Harville HM, Lyons RH, Washburn J, MacDonald J, Nürnberg P, Otto EA: A systematic approach to mapping recessive disease genes in individuals from outbred populations. *PLoS Genet* 2009;5:e1000353.
- ▶50 Machuca E, Benoit G, Nexø F, Tite MJ, Gribouval O, Pasetowski A, Brandström P, Loirat C, Niaudet P, Gabber MC, Antignac C: Genotype-phenotype correlations in non-Finnish congenital nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1209–1217.

EK 5. CUBN Makale

BRIEF COMMUNICATION www.jasn.org

Exome Sequencing Reveals Cubilin Mutation as a Single-Gene Cause of Proteinuria

Bugsu Ovunc,^{1*} Edgar A. Otto,^{2*} Virginia Vega-Warner,^{3*} Pawaree Saisawat,^{4*} Shazia Ashraf,^{5*} Gokul Ramaswami,^{6*} Hanan M. Fathy,² Dominik Schoeb,^{4*} Gil Chernin,^{4*} Robert H. Lyons,⁵ Engin Yilmaz,¹ and Friedhelm Hildebrandt^{1,6*}Departments of ¹Pediatrics and ²Human Genetics, ³Department of Biological Chemistry and DNA Sequencing Core, and ⁴Howard Hughes Medical Institute, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan; ⁵Department of Medical Biology, Hacettepe University, Ankara, Turkey; and ⁶The Pediatric Nephrology Unit, Alexandria University, Alexandria, Egypt

ABSTRACT

In two siblings of consanguineous parents with intermittent nephrotic-range proteinuria, we identified a homozygous deleterious frameshift mutation in the gene *CUBN*, which encodes cubilin, using exome capture and massively parallel re-sequencing. The mutation segregated with affected members of this family and was absent from 92 healthy individuals, thereby identifying a recessive mutation in *CUBN* as the single-gene cause of proteinuria in this sibship. Cubilin mutations cause a hereditary form of megaloblastic anemia secondary to vitamin B₁₂ deficiency, and proteinuria occurs in 50% of cases since cubilin is coreceptor for both the intestinal vitamin B₁₂-intrinsic factor complex and the tubular reabsorption of protein in the proximal tubule. In summary, we report successful use of exome capture and massively parallel re-sequencing to identify a rare, single-gene cause of nephropathy.

J Am Soc Nephrol 22: ●●●-●●●, 2011. doi: 10.1681/ASN.2011040337

Protein-encoding exons constitute only 1% of the human genome but harbor 85% of mutations in single-gene disorders.¹ Among about 2800 Mendelian diseases, for which the causative gene has been identified, mutations affect the coding region or canonical splice sites and thereby the function of the encoded proteins.¹ However, PCR amplification of thousands of candidate exons is costly and impractical and has hampered discovery of single-gene disease causes. Recently, re-sequencing of entire coding regions of the human genome, the "exome," with consecutive massively parallel (MP) re-sequencing has dramatically changed this situation.² This approach has been successfully applied to identify single-gene causes of rare diseases including Miller syn-

drome,³ Kabuki syndrome,³ Schinzel-Giedion syndrome,⁴ Bartter syndrome,⁵ and nephronophthisis type 10.⁶

Nephrotic syndrome (NS) is a common kidney disease characterized by proteinuria, hypoalbuminemia, generalized edema, and hyperlipidemia. Identification of recessive single-gene causes of NS has provided important insights into the pathogenesis of this enigmatic disorder. Whereas *NPHS2* mutations explain 10 to 25% of childhood NS, and two thirds of all NS in the first year of life can be explained by mutations in four genes only (*NPHS1*, *NPHS2*, *WT1*, and *PLCE1*),⁷ most other recessive causes of NS are very rare (1 to 3% of cases).⁸⁻¹³ Whereas single-gene causes of NS occur in childhood and adolescence, in more than about 70% of cases the causative gene muta-

tion is still unknown.⁷ This forbids the use of cohort studies for gene identification and necessitates the ability to identify disease-causing genes in single families. We therefore combined whole genome homozygosity mapping with consecutive whole human exome capture (WHEC) and massively parallel re-sequencing to overcome this limitation.⁶ In this way we here identify a homozygous deleterious frameshift mutation within the cubilin gene (*CUBN*) as a novel unexpected cause of proteinuria in two siblings with intermittent nephrotic-range proteinuria. This approach will likely be very useful to rapidly solve cases of rare nephropathies.

RESULTS

Two siblings (A 2410-21 and A2410-22) from family A2410 were discovered to have proteinuria on routine examina-

Received April 4, 2011. Accepted May 27, 2011.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

B.O. and E.A.O. contributed equally to this work.

Correspondence: Dr. Friedhelm Hildebrandt, Howard Hughes Medical Institute, University of Michigan Health System, 8220C MSRB III, 1150 West Medical Center Drive, Ann Arbor, Michigan 48109-5646. Phone: 734-615-7285 (office), 734-615-7895, -7896 (laboratory); Fax: 734-615-1386, -7770; E-mail: fhilde@umich.edu

Copyright © 2011 by the American Society of Nephrology

tion. The amount of proteinuria in both siblings had been fluctuating, sometimes reaching up to 2 g/d and then decreasing without any treatment (see Patients in the Concise Methods section). Given consanguinity of the parents of the two siblings with proteinuria, we hypothesized that its cause was a recessively inherited mutation. Therefore, we performed linkage analysis and homozygosity mapping in both affected siblings (A2410-21 and A2410-22) using Affymetrix 250K SNP StyI arrays. Nonparametric LOD score analysis¹⁴ was calculated for both siblings together, yielding seven segments of homozygosity by descent on chromosomes 3, 10, 14, 17, 21, and 22 with a total cumulative genomic length of 130 Mb (Figure 1). One segment of homozygosity on chromosome 10 coincided with *PLCE1*, a known locus for nephrotic syndrome. However, Sanger resequencing of all exons and adjacent exon-intron boundaries of *PLCE1* yielded no mutation in this gene.

We then performed whole human exome capture in one sibling (A2410-22) using NimbleGen 2.1M Human Exome Array with consecutive massively parallel re-sequencing on two lanes of an Illumina-GAIIX sequencing platform to identify the underlying disease-causing mutation. Sequencing generated 29.5 million single-end reads of 78 bases. Quality-filtered sequence reads were

aligned to the human reference genome assembly hg19 (NCBI build 37) using "CLC Genomics Workbench" software (CLC-bio, Aarhus, Denmark). About 20.1 million of these reads (68%) matched the targeted exons contributing to a median coverage of 11-fold (mean: 14-fold). No coverage was obtained for about 2.2% of all 180,000 targeted exons. CLC Genomics Workbench software was further used to call single nucleotide variants or small insertions/deletions. By filtering for homozygous-only variants, we identified 1968 variants from the reference sequence with at least fivefold sequence coverage. Of these, only 48 were not known single nucleotide polymorphisms, either reported in the database dbSNP130 or the 1000 genomes project. When examining the segments of homozygosity (132 Mb total), for which we had initially generated a positional candidate hypothesis by whole genome homozygosity mapping, only 11 nonsynonymous exonic variants remained. One of these changes was a novel 1-bp homozygous deletion (c.8355delA) in exon 53 of the gene *CUBN* (cubilin), resulting in a frameshift and a predicted premature truncation of the encoded protein (p.S2785fsX19) (Figure 2). We confirmed this mutation by exon-PCR and Sanger sequencing homozygously in both affected siblings and heterozy-

gously in both parents (Figure 3). We then searched for additional *CUBN* mutations in a large worldwide cohort of 540 families with NS in whom we had generated homozygosity mapping data by WGHM. Four affected individuals (A155-21, A849-21, A1605-21, and A2591-21) of these families showed a genomic segment of >2 Mb of homozygosity at the *CUBN* locus. However, direct Sanger sequencing of all exons of *CUBN* in these individuals did not yield any additional mutations (data not shown).

DISCUSSION

We here detected a novel 1-bp homozygous deletion of the *cubilin* (*CUBN*) gene as the cause of proteinuria in two siblings with NS using a combined strategy of homozygosity mapping and WHEC with massively parallel re-sequencing. The finding represented an unexpected cause of NS because intermittent gross proteinuria is rare in patients with *CUBN* mutations who are known to have Iverslund-Grasbeck syndrome (IGS; OMIM ID #261100), a form of congenital megaloblastic anemia due to vitamin B₁₂ deficiency caused by a defect in the vitamin B₁₂/intrinsic factor receptor (*CUBN*; OMIM ID #602997).

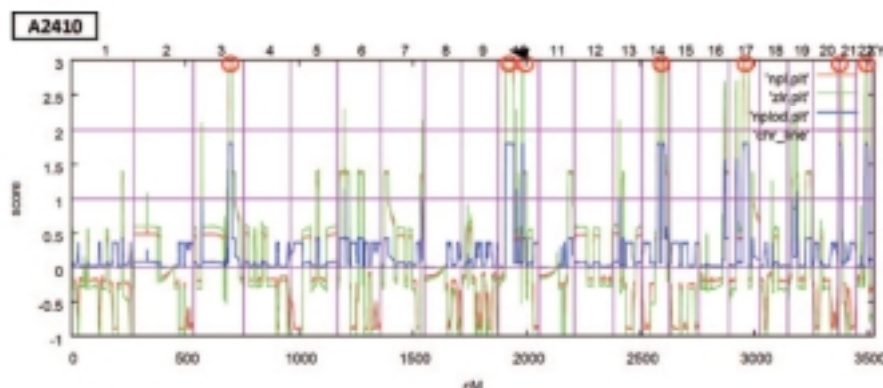


Figure 1. Nonparametric lod (NPL) scores across the human genome in two siblings with intermittent gross proteinuria of consanguinous family A2410 reveal four regions of homozygosity by descent. The x-axis shows Affymetrix 250K SNP StyI array SNP positions on human chromosomes concatenated from p-ter (left) to q-ter (right). Genetic distance is given in centimorgan (cM). Seven maximum NPL peaks (red circles) indicate candidate regions of homozygosity by descent. The arrow shows the region of homozygosity in chromosome 10, which includes *CUBN*.

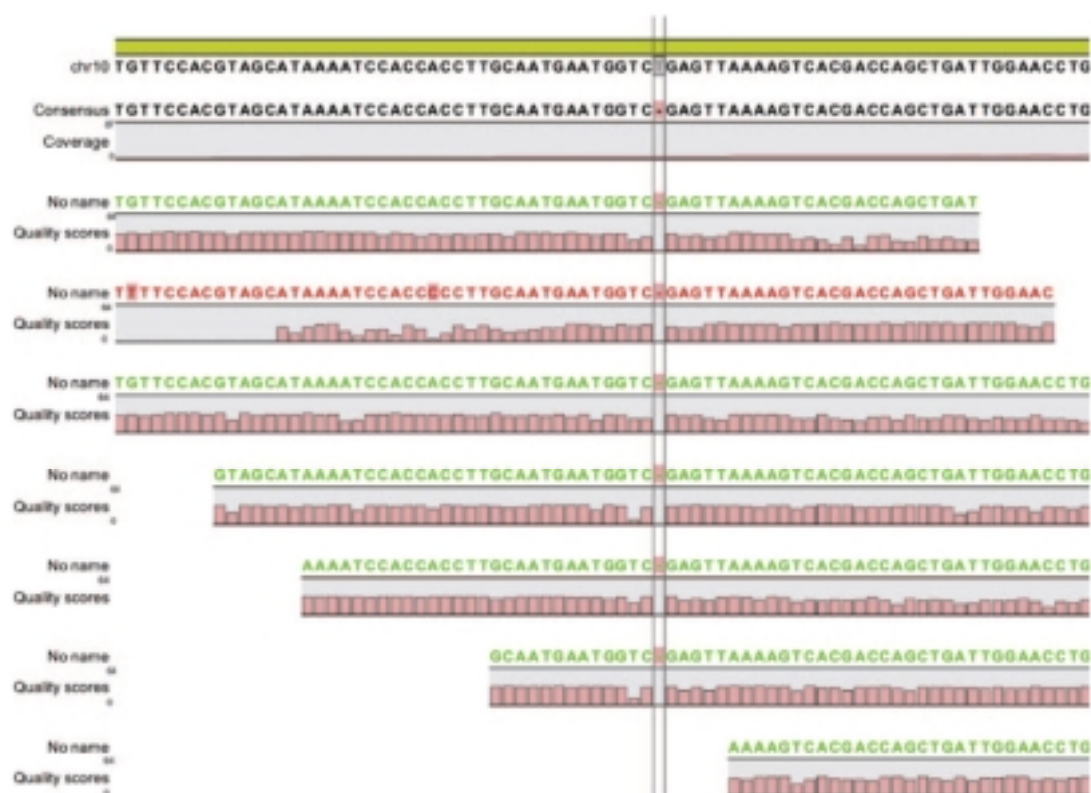


Figure 2. The novel single-base homozygous deletion (c.8355delA) in exon 53 of the cubilin (*CUBN*) gene that causes nephrotic syndrome in family A2410. Note that the sequence shown depicts the plus strand of chromosome 10 and that *CUBN* is encoded on the reverse strand, therefore showing a deletion of a T [thymine] rather than A [adenine].

The renal effects of genetic ablation of cubilin in a mouse model has been reported previously.¹⁵ It was observed that proximal tubule cells did not localize the receptor protein “amnionless” to the plasma membrane in the absence of cubilin, indicating a mutual dependency of cubilin and amnionless to form a functional membrane receptor complex. Furthermore, cubilin-deficient mice exhibited markedly decreased uptake of albumin by proximal tubule cells, leading to proteinuria. It was shown that cubilin is essential for albumin reabsorption by proximal tubule cells.¹⁵ Recently, an association between a missense variant (I2984V) in the *CUBN* gene and both urinary albumin-to-creatinin ratio and microalbuminuria has been

identified in a genome-wide association study.¹⁶

In this study we detected by total human exome capture a novel homozygous deleterious *CUBN* mutation as the cause of proteinuria in a family in whom absence of megaloblastic anemia did not elicit any suspicion of IGS, most likely because of their young age. IGS represents the full clinical picture of *CUBN* mutations. This is an example of molecular genetics providing a diagnostic tool that is more sensitive and accurate than clinical diagnosis, a possibility that will be strongly enhanced as WHEC and massively parallel re-sequencing become more established.

Moreover, genetic diagnostics might inform therapy: Recently, another case

with IGS and *CUBN* mutation was reported. The patient was a 15-year-old girl of German descent who presented with megaloblastic anemia, selective proteinuria, and funicular myelosis. After intravenous vitamin B₁₂ therapy and consecutive intermittent intramuscular injection of vitamin B₁₂, the patient’s neurologic symptoms ceased completely after 2 months, hematologic parameters normalized within 5 months, and although proteinuria was persistent, renal function did not deteriorate.¹⁷ Likewise, the siblings described here might benefit from vitamin B₁₂ replacement therapy.

At the cellular level, IGS, a monogenic cause of megaloblastic anemia (MGA; OMIM ID #261100), is due to defective intestinal B₁₂ malabsorption and/or re-

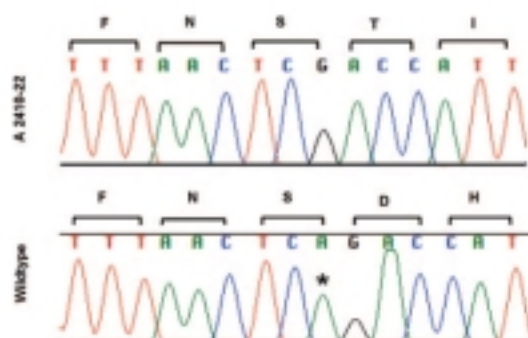


Figure 3. Novel homozygous mutation in *CUBN*. A novel homozygous of a single-bp deletion is shown that leads to a frameshift mutation in exon 53 of *CUBN* (c.8355delA; p.S2785fsX19) in patient A2410-22 who has intermittent nephrotic range proteinuria. Nucleotide sequence traces and deduced amino acid sequence are shown for mutated (top) and wild-type (bottom) sequences. Adenine deleted in A2410-22 is marked with an asterisk in the wild-type sequence. Mutation numbering is based on *CUBN* human reference sequence NM_001081.3, where +1 corresponds to the A of the ATG translation start codon.

nal tubular protein reabsorption. IGS occurs worldwide, but its prevalence is higher in several Middle Eastern countries and in Norway, and highest in Finland (0.8 in 100,000 individuals). By genetic mapping, Finnish-type IGS has been mapped to the *CUBN* gene locus, whereas Norwegian-type IGS has been mapped to the *AMN* gene locus.¹⁶ In families from the Mediterranean an Israeli Jewish family of Tunisian origin,¹⁸ a Tunisian family,¹⁹ and Turkish families²⁰ two different *AMN* mutations and three different *CUBN* mutations were detected. Outside these geographic regions, only scattered cases have been described, for example, South Africa,²¹ France,²² the United States,²³ and Taiwan.²⁴ The Scandinavian cases were typical examples of founder effects, whereas in the Mediterranean region, instead of a founder effect, high degrees of consanguinity exposed rare homozygous mutations in both genes.

We here describe a novel homozygous frameshift mutation in two siblings from family A2410. Sibling A2410-21 had intermittent nephrotic range proteinuria and sibling A2410-22 had intermittent nephrotic range proteinuria along with epilepsy as the only clinical presentations. Anemia was not a part of their clinical course. *CUBN* mutations represent a

recessive single-gene cause of proteinuria. Recessive single-gene disease causes convey full penetrance of a disease. They are thereby distinct from genetic variants that are found only to be associated with disease because associated variants usually explain only a low percentage of the phenotypic variance, as is the case for instance in the *MYH9* and *APOL1* variants that have been found in nephrotic syndrome.²⁵

In conclusion, the combination of homozygosity mapping in consanguineous siblings together with WHEC and massively parallel re-sequencing provides a tool for the evaluation of patients with undiagnosed genetic diseases. Our findings also indicate that IGS should be considered when diagnosing individuals with proteinuria to identify potentially treatable variants.

CONCISE METHODS

Patients

We obtained blood samples, pedigrees, and clinical information after receiving informed consent (<http://www.renalgenes.org>) from all patients. Approval for experiments on humans was obtained from the University of Michigan Institutional Review Board. One of the siblings of a consanguineous family from

Egypt (A2410-22) was found to have proteinuria during a routine urine analysis preceding an operation for hypospadias. A2410-22 had proteinuria of 790 mg/d. Serum creatinine was 0.4 mg/dl, serum protein 6.5 g/L, serum albumin 4.2 g/L with normal creatinine clearance, and normal C3 levels at 4 years of age. Then the other sibling of the family (A2410-21) was tested for proteinuria. Sibling A2410-21 had proteinuria of 380 mg/d. Serum creatinine was 0.4 mg/dl, total serum protein 6.8 g/L, and serum albumin 3.5 g/L. Creatinine clearance and complement 3 (C3) level were normal at 5 years of age. Both siblings were treated with ACE inhibitors with no improvement of their condition. The amount of proteinuria in both siblings had been fluctuating, sometimes reaching up to 2 g/d and then decreasing without any treatment. However, no edema developed and no immunosuppressive treatment was instituted. Renal biopsy was not performed. As for megaloblastic anemia, both siblings had normal hemoglobin levels and the red blood cell indices were also within normal range for their ages. A2410-22 has had complex partial seizures since he was 5-months old, requiring treatment with carbamazepine. He has been seizure free on carbamazepine for 1 year now.

Homozygosity Mapping

For genome-wide homozygosity mapping, the GeneChip Human Mapping 250K StyI Array from Affymetrix was used. Nonparametric LOD scores were calculated using a modified version of the program GENEHUNTER^{26,27} through stepwise use of a sliding window with sets of 110 SNPs. The program ALLEGRO was employed to identify regions of homozygosity as described,²⁸ using a disease allele frequency of 0.0001 and CEU marker allele frequencies.

Whole Human Exome Capture

Genomic DNA (10 µg) from affected sibling A2410-22 was captured using the NimbleGen 2.1M Human Exome Array (Roche/NimbleGen) according to protocol. The NimbleGen 2.1M Human Exome Array contains oligonucleotide probes that target approximately 180,000 exons of 18,675 protein-coding genes from the consensus coding sequence (CCDS) set in addition to 551 micro-RNAs. To generate random start positions and to reduce fragment sizes to be appropriate for the illumina

genome analyzer, high-throughput sequencing, captured and amplified DNA fragments in the range of 500 to 700 bp were subsequently modified using Bal31 exonuclease and DNase-I as published previously.²⁹

Massively Parallel Re-sequencing, Sequence Alignment, and Variant Calling

Library construction of the modified captured DNA fragments was performed using the "Genomic DNA Sample Prep Kit" according to the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego). The library was sequenced on two lanes of an Illumina genome analyzer (GAII) as 80 base single-end reads. Image analysis and base calling were generated by the Illumina pipeline 1.5.1 using default parameters. Subsequent sequence alignment to the human genome reference genome (hg19) and variant calling was performed using CLC Genomics Workbench software. Only variants with an allele frequency of more than 80% were called to identify homozygous variants.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients and their physicians for contribution of blood samples and clinical data. This work was supported by grants to F.H. from the National Institutes of Health (DK076683, BC1-DK086542), from the NephCure Foundation, and from the Thrasher Research Fund. F. Hildebrandt is an Investigator of the Howard Hughes Medical Institute, a Doris Duke Distinguished Clinical Scientist, and the Frederick G.L. Huetwell Professor for the Cure and Prevention of Birth Defects.

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

- Cooper DN, Krawczak M, Antonarakis SE: The nature and mechanisms of human gene mutation. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th ed., edited by Scriver C, Beaudet al, Sly WS, Valle D, New York, McGraw-Hill, 1995, pp 259–291
- Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW,

- Tabor HK, Dent KM, Huff CD, Shannon PT, Jabs EW, Nickerson DA, Shendure J, Bamshad MJ: Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 42: 30–35, 2010
- Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve H, Bock AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC, Lee C, Turner EH, Smith JD, Rieder MJ, Yoshiuro K, Matsumoto N, Ohta T, Nikawa N, Nickerson DA, Bamshad MJ, Shendure J: Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* 42: 790–793, 2010
- Hoischen A, van Bon BW, Glissen C, Arts P, van Lier B, Steehouwer M, de Vries P, de Reuver R, Wiskamp N, Mortier G, Devriendt K, Amorim MZ, Revencu N, Kidd A, Barbosa M, Turner A, Smith J, Oley C, Henderson A, Hayes IM, Thompson EM, Brunner HG, de Vries BB, Veltman JA: De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome. *Nat Genet* 42: 483–485, 2010
- Choi M, Schoff UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, Bakaloglu A, Ozon S, Serjadj S, Nelson-Williams C, Farhi A, Mane S, Lifton RP: Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 19096–19101, 2009
- Otto EA, Hurd TW, Airik R, Chaki M, Zhou W, Stoetzel C, Patel SB, Levy S, Ghosh AK, Murga-Zamalloa CA, van Rooijwijk J, Lettboer SJ, Sang L, Giles RH, Liu Q, Coene KL, Estrada-Cuzzano A, Collin RW, McLaughlin HM, Held S, Kaseruki JM, Ramaswami G, Conte J, Lopez I, Washburn J, Macdonald J, Hu J, Yamashita Y, Maher ER, Guay-Woodford LM, Neumann HP, Obermüller N, Koenekeop RK, Bergmann C, Bai X, Lewis RA, Katsanis N, Lopes V, Williams DS, Lyons RH, Dang CV, Brito DA, Dias MB, Zhang X, Cavalcoti JD, Nürnberg G, Nürnberg P, Pierce EA, Jackson PK, Antignac C, Saunier S, Roepman R, Döllfus H, Khanna H, Hildebrandt F: Candidate exome capture identifies mutation of SDOCAG8 as the cause of a retinal-renal ciliopathy. *Nat Genet* 42: 840–850, 2010
- Hinkes BG, Mucha B, Vlangos CN, Gbadegesin R, Liu J, Hasselbacher K, Hangan D, Ozaltin F, Zenker M, Hildebrandt F: Arbeitsgemeinschaft für Paediatriche Nephrologie Study Group: Nephrotic syndrome in the first year of life: Two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2). *Pediatrics* 119: e907–e919, 2007
- Zenker M, Aigner T, Wendler O, Tralau T, Müntefering H, Fenski R, Ritz S, Schumacher V, Royer-Pokora B, WGH E, Cochat P, Bouvier R, Kraus C, Mark K, Madlon H, Dötlich J, Rascher W, Maniuk-Chudek I, Lennert T, Neumann LM, Reis A: Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet* 13: 2625–2632, 2004
- Hasselbacher K, Wiggins RC, Motejas V, Hinkes BG, Mucha B, Hoskins BE, Ozaltin F, Nürnberg G, Becker C, Hangan D, Poh M, Kuwertz-Bröking E, Griebel M, Schumacher V, Royer-Pokora B, Bakaloglu A, Nürnberg P, Zenker M, Hildebrandt F: Recessive missense mutations in LAMB2 expand the clinical spectrum of LAMB2-associated disorders. *Kidney Int* 70: 1008–1012, 2006
- Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, Vlangos CN, Seelow D, Nürnberg G, Garg P, Verma R, Chaib H, Hoskins BE, Ashraf S, Becker C, Hennies HC, Goyal M, Whanani BL, Schachter AD, Mudumana S, Drummond I, Kerjaschi D, Waldherr R, Dietrich A, Ozaltin F, Bakaloglu A, Cleper R, Basel-Vanagaithe L, Pohl M, Griebel M, Tsypkin AN, Soylu A, Müller D, Sorli CS, Burney TD, Katan M, Liu J, Attanasio M, O'Toole JF, Hasselbacher K, Mucha B, Otto EA, Airik R, Kispert A, Kelley GG, Sznocka AV, Gudermann T, Holzman LB, Nürnberg P, Hildebrandt F: Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet* 38: 1397–1405, 2006
- Diomedè-Camassei F, Di Giandomenico S, Santorelli FM, Caridi G, Piemonte F, Montini G, Ghiggeri GM, Murer L, Barisoni L, Pastore A, Muda AO, Valente ML, Bertini E, Emma F: COQ2 nephropathy: A newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol* 18: 2773–2780, 2007
- López LC, Schuelke M, Quinzii CM, Kanki T, Rodenburg RJ, Naini A, Dimauro S, Hirano M: Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet* 79: 1125–1129, 2006
- Shih NY, Li J, Karpiskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner JH, Shaw AS: Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 286: 312–315, 1999
- Hildebrandt F, Heeringa SF, Rüschemdorf F, Attanasio M, Nürnberg G, Becker C, Seelow D, Huebner N, Chemin G, Vlangos CN, Zhou W, O'Toole JF, Hoskins BE, Wolf MT, Hinkes BG, Chaib H, Ashraf S, Schoeb DS, Ovunc B, Allen SJ, Vega-Warner V, Wise E, Harville HM, Lyons RH, Washburn J, Macdonald J, Nürnberg P, Otto EA: A systematic approach to mapping recessive disease genes in individuals from outbred populations. *PLoS Genet* 5: e1000353, 2009
- Amselem S, Gburek J, Hamard G, Nielsen R, Willnow TE, Devuyt O, Niexo E, Verroust PJ, Christensen EI, Kozyrski R: Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 21: 1859–1867, 2010
- Böger CA, Chen NH, Tin A, Olden M, Köt-

- tgen A, Deboer IH, Fuchsberger C, O'Seaghdha CM, Pattaro C, Teumer A, Liu CT, Glazer NL, U M, O'Connell JR, Tanaka T, Peralta CA, Kutalik Z, Luan J, Zhao JH, Hwang SJ, Akyzbekova E, Kramer H, von der Harst P, Smith AV, Lohman K, de Andrade M, Hayward C, Kollerits B, Tönjes A, Aspelund T, Ingelsson E, Eiriksdottir G, Launer LJ, Harris TB, Shuldiner AR, Mitchell BD, Arking DE, Franceschini N, Boerwinkle E, Egan J, Hernandez D, Reilly M, Townsend RR, Lumley T, Siscovick DS, Psaty BM, Kestenbaum B, Hartman T, Bergmann S, Vollenweider P, Waeber G, Mooser V, Watenworth D, Johnson AD, Florez JC, Meigs JB, Lu X, Turner ST, Atkinson EJ, Leek TS, Aasraed K, Skorpen F, Syvänen AC, Ilig T, Baumert J, Koenig W, Krämer BK, Devuyst O, Mychalcek J, Minelli C, Bakker SJ, Kedenko L, Paulweber B, Coassin S, Endlich K, Kroemer HK, Bähr R, Stracke S, Völzke H, Stumvoll M, Mügi R, Campbell H, Vitart V, Hastie ND, Gudnason V, Kardio SL, Liu Y, Polasek O, Curhan G, Kronenberg F, Prokopenko I, Rudan I, Amlöv J, Hallan S, Navis G; the CKD-Gen Consortium, Parsa A, Ferrucci L, Coresh J, Shlipak MG, Bull SB, Paterson AD; Paterson on behalf of DCCT/EDIC, Wichmann HE, Wareham NJ, Loos RJ, Rotter J, Pramstaller PP, Cupples LA, Beckmann JS, Yang Q, Heid IM, Rettig R, Dreisbach AW, Bochud M, Fox CS, Kao WH: *CUBN* is a gene locus for albuminuria. *J Am Soc Nephrol* 22: 555–570, 2011
17. Hauck FH, Tanner SM, Henker J, Laess MW: Imerlund-Gräsbeck syndrome in a 15-year-old German girl caused by compound heterozygous mutations in *CUBN*. *Eur J Pediatr* 167: 671–675, 2008
18. Tanner SM, Aminoff M, Wright FA, Uyanaradchi S, Kuronen M, Saarinen A, Massika O, Mandel H, Broch H, de la Chapelle A: Amnionless, essential for mouse gastrulation, is mutated in recessive hereditary megaloblastic anemia. *Nat Genet* 33: 426–429, 2003
19. Bouchlaka C, Maktouf C, Mahjoub B, Ayadi A, Sfar MT, Soud M, Gueddich N, Belhadjal Z, Rebai A, Abdelhak S, Dellagi K: Genetic heterogeneity of megaloblastic anaemia type 1 in Tunisian patients. *J Hum Genet* 52: 262–270, 2007
20. Tanner SM, U Z, Bisson R, Acar C, Oner C, Oner R, Cetin M, Abdelazal MA, Ismail EA, Ussers W, Krahe R, Broch H, Gräsbeck R, de la Chapelle A: Genetically heterogeneous selective intestinal malabsorption of vitamin B12: founder effects, consanguinity, and high clinical awareness explain aggregations in Scandinavia and the Middle East. *Hum Mutat* 23: 327–333, 2004
21. Stones DK, Ferreira M: Imerlund-Gräsbeck syndrome in an African patient. *J Trop Pediatr* 45: 106–107, 1999
22. Flecheilles O, Schneider P, Lesewe JF, Banuchel A, Vannier JP, Tron P, Schaison G: Imerlund's disease. Clinical and biological aspects. Apropos of 6 cases. *Arch Pediatr* 4: 862–866, 1997 (French)
23. Mackenzie IL, Donaldson RM Jr, Trier JS, Nathan VI: Ileal mucosa in familial selective vitamin B12 malabsorption. *N Engl J Med* 286: 1021–1025, 1972
24. Lin SH, Sourial NA, Lu KC, Hsueh EJ, Imerlund-Gräsbeck syndrome in a Chinese family with distinct skin lesions refractory to vitamin B12. *J Clin Pathol* 47: 956–958, 1994
25. Genovese G, Tonna SJ, Knob AJ, Appel GB, Katz A, Bernhardt AJ, Needham AW, Lazarus R, Pollak MR: A risk allele for focal segmental glomerulosclerosis in African Americans is located within a region containing *APOL1* and *MYH9*. *Kidney Int* 78: 698–704, 2010
26. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES: Parametric and nonparametric multipoint linkage analysis: A unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 58: 1347–1363, 1996
27. Strauch K, Fimmers R, Kurz T, Deichmann KA, Wienker TF, Baur MP: Parametric and nonparametric multipoint linkage analysis with imprinting and two-locus-trait models: Application to mite sensitization. *Am J Hum Genet* 66: 1945–1957, 2000
28. Gudbjartsson DF, Jonasson K, Frigge ML, Kong A: Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis. *Nat Genet* 25: 12–13, 2000
29. Otto EA, Ramaswami G, Janssen S, Chaki M, Allen SJ, Zhou W, Aink R, Hurd TW, Ghosh AK, Wolf MT, Hoppe B, Neuhaus TJ, Bockenauer D, Milford DV, Soliman NA, Antignac C, Saunier S, Johnson CA, Hildebrandt F: the GPN Study Group: Mutation analysis of 18 nephronophthisis associated ciliopathy disease genes using a DNA pooling and next generation sequencing strategy. *J Med Genet* 48: 105–116, 2010